

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij  
Molekularne bioznanosti

**Marko Lilić**

**MOLEKULARNO ODREĐIVANJE ALELA *RHD*  
U POPULACIJI SEROLOŠKI RhD NEGATIVNIH  
DAVATELJA KRVI SJEVEROZAPADNE HRVATSKE**

**doktorska disertacija**

**Osijek, 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković

Doktorska disertacija

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij  
Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti  
Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

### MOLEKULARNO ODREĐIVANJE ALELA *RHD* U POPULACIJI SEROLOŠKI RhD NEGATIVNIH DAVATELJA KRVI SJEVEROZAPADNE HRVATSKE

Marko Lilić

**Disertacija je izrađena u:** Općoj bolnici Varaždin, Ivana Meštrovića bb, 42000 Varaždin  
i Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb

**Mentor 1:** doc. dr. sc. Branka Golubić Čepulić, dr. med., docentica

**Mentor 2:** izv. prof. dr. sc. Marina Samardžija, dr. med., znanstvena savjetnica

#### Kratki sažetak doktorske disertacije:

Molekularna dijagnostika može definirati alele *RHD* čiji su produkti neotkriveni rutinskim serološkim testiranjem. Cilj istraživanja bio je opisati alele *RHD* i njihovu ekspresiju u populaciji serološki RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske. Unatoč relativno malobrojnoj i homogenoj populaciji, rezultati su potvrdili rijetke varijante gena sustava Rh. Rezultati istraživanja potvrđuju mogućnost imunizacije RhD negativnih osoba transfuzijom krvnih pripravaka tih davatelja bez molekularne obrade. Predložen je algoritam uvođenja molekularne dijagnostike alela sustava Rh za rutinsko testiranje davatelja krvi.

**Broj stranica:** 153

**Broj slika:** 39

**Broj tablica:** 22

**Broj literaturnih navoda:** 257

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** krvne grupe, sustav Rh, *RHD*, molekularna tipizacija, varijante RhD

**Datum obrane:** 9. svibnja 2022. godine

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Valentina Pavić, izvanredna profesorica
2. prof. dr. sc. Sanja Kapitanović, redovita profesorica
3. prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica
4. (zamjena) doc. dr. sc. Esma Čečuk-Jeličić, docentica

**Disertacija je pohranjena u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
University of Dubrovnik  
Ruđer Bošković Institute

PhD thesis

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study  
Molecular Biosciences

**Scientific Area:** Interdisciplinary area of science

**Scientific Fields:** Biology and Basic medical sciences

### MOLECULAR IDENTIFICATION OF *RHD* ALLELES IN SEROLOGICALLY RhD NEGATIVE BLOOD DONORS FROM NORTHWESTERN CROATIA

Marko Lilić

**Thesis performed at:** General Hospital Varaždin, Ivana Meštrovića bb, 42000 Varaždin, Croatia and University Hospital Centre Zagreb, Kišpatićeva 12, Zagreb, Croatia

**Supervisor 1:** Branka Golubić Čepulić, MD, PhD, assistant professor

**Supervisor 2:** Marina Samardžija, MD, PhD, professor

**Short abstract:**

*RHD* alleles can be defined by molecular diagnostics if their products are missed by routine serological testing. The aim of this study was to describe the *RHD* alleles and their expression in serologically RhD negative blood donors from northwestern Croatia. Despite its relatively small size and homogeneity, rare Rh alleles were identified in this population. The results indicate the immunization potential in RhD negative persons by transfusion of blood products derived from these donors without molecular testing. The algorithm for introducing molecular diagnostics in routine blood donor testing within Rh system has been proposed.

**Number of pages:** 153

**Number of figures:** 39

**Number of tables:** 22

**Number of references:** 257

**Original in:** Croatian

**Key words:** blood groups, Rh system, *RHD*, molecular typing, RhD variants

**Date of the thesis defense:** May 9, 2022

**Reviewers:**

1. Valentina Pavić, PhD
2. Sanja Kapitanović, MD, PhD
3. Vera Cesar, PhD
4. (substitute) Esmā Čečuk-Jeličić, PhD

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

*Sparkle my scenery  
With turquoise waterfall  
With beauty underneath,  
The Ever Free...  
Tuck me in  
Beneath the blue,  
Beneath the pain,  
Beneath the rain.  
Goodnight kiss for a child in time,  
Swaying blade my lullaby.  
On the shore we sat and hoped  
Under the same pale moon  
Whose guiding light chose you,  
Chose you all...*

Tuomas Lauri Johannes Holopainen  
Floor Jansen  
(*The Poet and the Pendulum*, Nightwish)

Zahvaljujem svojim mentoricama doc. prim. dr. sc. Branki Golubić Čepulić, dr. med. iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb i prof. prim. dr. sc. Marini Samardžija, dr. med. iz Kliničkog bolničkog centra Osijek, ponajprije na strpljenju, podršci te stručnom vodstvu u izradi ove disertacije.

Beskrajno zahvaljujem Koraljki Gojčeta, spec. med. biochem. iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb za sve sate koje smo proveli u izvođenju testova i analiziranju rezultata, za izrazito nesebičnu logističku potporu i prijateljsku podršku.

Puno hvala prim. dr. sc. Mireli Raos, dr. med. iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb na važnoj ulozi u testiranju i vrijednim stručnim savjetima.

Hvala i Gordani Jaklin, dr. med. iz Opće bolnice Varaždin, također na strpljenju, organizaciji logistike i pružanju prilike da izradu svoje disertacije vežem uz Varaždin te da tako ovim istraživanjem doprinesem obogaćivanju znanstvenih spoznaja iz svojega rodnog grada.

Veliko hvala i povjerenstvu za ocjenu doktorske disertacije, prof. dr. sc. Valentini Pavić, prof. dr. sc. Sanji Kapitanović i prof. dr. sc. Veri Cesar na susretljivosti, uloženom trudu i vrlo konstruktivnim raspravama koje su kvalitativno obogatile disertaciju.

I naravno... Vanji i Siniši, Morani i Mariju, Ljubici, Tomeku, Goranu, Saši, Mariji te svim ovdje neimenovanim ostalima bez kojih bi moja svakodnevnica bila nepotpuna... Hvala vam za sve što jeste i radite, da mi budete učitelji i pratitelji u veličanstvenoj predstavi koja se zove život!

Na kraju, ili ponajprije, jedno veliko hvala od srca i mojoj mami, za sve, za sve...

*I asked my mother what she knows about love,  
She said, boy, not that much, but I do know,  
That my heart led me to make honest choices,  
Where to go to, who to live with, with whom to share.*

Ruben Annink, Floor Jansen

*(Van De Liefde Weet Ik Niets / I Don't Know a Thing About Love)*

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Sustav krvnih grupa Rh .....</b>	<b>2</b>
1.1.1.	Haplotip, genotip, fenotip i nomenklatura sustava Rh .....	2
1.1.2.	Protein RhAG .....	7
1.1.3.	Biokemija proteina i funkcija antigena sustava Rh .....	8
1.1.4.	Molekularna genetika gena sustava Rh .....	10
1.1.5.	Evolucija gena sustava Rh .....	14
<b>1.2.</b>	<b>Varijante gena <i>RHD</i> .....</b>	<b>16</b>
1.2.1.	Razvoj spoznaja o varijantama antigena D .....	16
1.2.2.	Nomenklatura alela <i>RHD</i> .....	18
1.2.3.	Parcijalne D-varijante i epitopi antigena D .....	20
1.2.4.	D-varijante slabog fenotipa .....	21
1.2.5.	DEL fenotip .....	22
1.2.6.	Molekularna genetika RhD negativnog fenotipa .....	23
1.2.7.	Filogenetičke grupe alela <i>RHD</i> .....	24
<b>1.3.</b>	<b>Varijante gena <i>RHCE</i> .....</b>	<b>25</b>
1.3.1.	Aleli <i>RHCE</i> odgovorni za polimorfizam antigena C i c .....	25
1.3.2.	Aleli <i>RHCE</i> odgovorni za polimorfizam antigena E i e .....	26
<b>1.4.</b>	<b>Metode u imunohematologiji .....</b>	<b>27</b>
1.4.1.	Serološke metode određivanja antigena D .....	27
1.4.2.	Molekularne metode za određivanje gena specifičnih antigena eritrocita, leukocita i trombocita .....	28
<b>1.5.</b>	<b>Klinička važnost protutijela usmjerenih na antigene sustava Rh .....</b>	<b>29</b>
1.5.1.	Aloprotutijela anti-D .....	30
1.5.2.	Aloprotutijela anti-C, -c, -E, -e .....	31
1.5.3.	Klinički sindromi povezani s protutijelom anti-D .....	31
1.5.4.	Varijante <i>RHD</i> i transfuzijsko liječenje .....	33
<b>2.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>35</b>
<b>3.</b>	<b>ISPITANICI, MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1.</b>	<b>Ispitanici .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.</b>	<b>Plan istraživanja .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3.</b>	<b>Serološko testiranje uzoraka .....</b>	<b>38</b>
3.3.1.	Direktno određivanje antigena D tehnikom u mikrokartici .....	38
3.3.2.	Određivanje antigena D u indirektnom antiglobulinskom testu .....	40
3.3.3.	Određivanje antigena C, c, E i e .....	40

<b>3.4.</b>	<b>Molekularno testiranje uzoraka .....</b>	<b>41</b>
3.4.1.	Izolacija DNA .....	42
3.4.1.1.	Automatizirana izolacija DNA .....	42
3.4.1.2.	Izolacija DNA na kolonama s centrifugiranjem .....	42
3.4.2.	PCR u stvarnom vremenu – tehnologija FluoGene .....	43
3.4.3.	Testovi RBC-FluoGene .....	45
3.4.3.1.	Probirni test za <i>RHD</i> .....	46
3.4.3.2.	Test za proširenu tipizaciju alela sustava Rh .....	47
3.4.4.	Test za određivanje zigotnosti lokusa <i>RHD</i> metodom PCR-SSP .....	49
3.4.5.	Sekvenciranje DNA .....	52
<b>3.5.</b>	<b>Test adsorpcije i elucije .....</b>	<b>55</b>
<b>3.6.</b>	<b>Statističke metode .....</b>	<b>56</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1.</b>	<b>Serološko određivanje antigena sustava Rh .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.</b>	<b>Molekularno određivanje alela sustava Rh .....</b>	<b>59</b>
4.2.1.	Molekularno testiranje alela <i>RHCE</i> .....	59
4.2.2.	Molekularno testiranje alela <i>RHD</i> .....	61
<b>4.3.</b>	<b>Varijante gena <i>RHD</i> i <i>RHCE</i> u ispitivanoj populaciji .....</b>	<b>63</b>
4.3.1.	<i>RHD*01EL.32 (RHD*DEL32)</i> .....	63
4.3.2.	<i>RHD*01EL.44 (RHD*DEL44)</i> .....	67
4.3.3.	Hibridni alel na lokusu <i>RHCE</i> u <i>RHD</i> negativnog ispitanika .....	71
<b>4.4.</b>	<b>Haplotipovi u ispitivanoj populaciji .....</b>	<b>77</b>
<b>4.5.</b>	<b>Genotipovi u ispitivanoj populaciji .....</b>	<b>78</b>
<b>4.6.</b>	<b>Usporedba učestalosti alela <i>RHCE</i> i <i>RHD</i> s drugim populacijama .....</b>	<b>79</b>
4.6.1.	Usporedba učestalosti alela <i>RHCE</i> .....	79
4.6.2.	Usporedba učestalosti alela <i>RHD</i> .....	80
<b>4.7.</b>	<b>Algoritam molekularnog određivanja alela sustava Rh u davatelja krvi .....</b>	<b>81</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>83</b>
<b>5.1.</b>	<b>Osvrt na populaciju ispitanika .....</b>	<b>85</b>
<b>5.2.</b>	<b>Presjek podataka o pronađenim alelima Rh s dosadašnjim istraživanjima .....</b>	<b>88</b>
5.2.1.	Alel <i>RHD*DEL32</i> .....	88
5.2.2.	Alel <i>RHD*DEL44</i> .....	91
5.2.3.	Hibridni alel na lokusu <i>RHCE</i> .....	95
<b>5.3.</b>	<b>Usporedba rezultata istraživanja s drugim populacijama .....</b>	<b>103</b>
<b>5.4.</b>	<b>Razrada algoritama molekularnog određivanja alela sustava Rh u davatelja krvi u Hrvatskoj .....</b>	<b>106</b>

<b>5.5.</b>	<b>Suvremena praktična primjena molekularnih metoda u sustavu Rh .....</b>	<b>109</b>
5.5.1.	Predviđanje fenotipa RhD iz DNA .....	109
5.5.2.	Određivanje <i>RHD</i> iz fetalne DNA .....	110
5.5.3.	Test za određivanje zigotnosti lokusa <i>RHD</i> .....	111
<b>5.6.</b>	<b>Izazovi i budućnost određivanja alela sustava Rh .....</b>	<b>112</b>
5.6.1.	Baze sekvenci i alela sustava Rh .....	112
5.6.2.	Primjena sekvenciranja sljedeće generacije za alele sustava Rh .....	113
5.6.3.	Korelacija gen → antigen u nomenklaturi alela sustava Rh .....	116
<b>5.7.</b>	<b>Usporedni prikaz rezultata istraživanja .....</b>	<b>119</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>123</b>
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	<b>140</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>142</b>
<b>10.</b>	<b>PRILOZI .....</b>	<b>144</b>
<b>11.</b>	<b>POPIS KRATICA .....</b>	<b>150</b>
<b>12.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>151</b>



## 1. UVOD

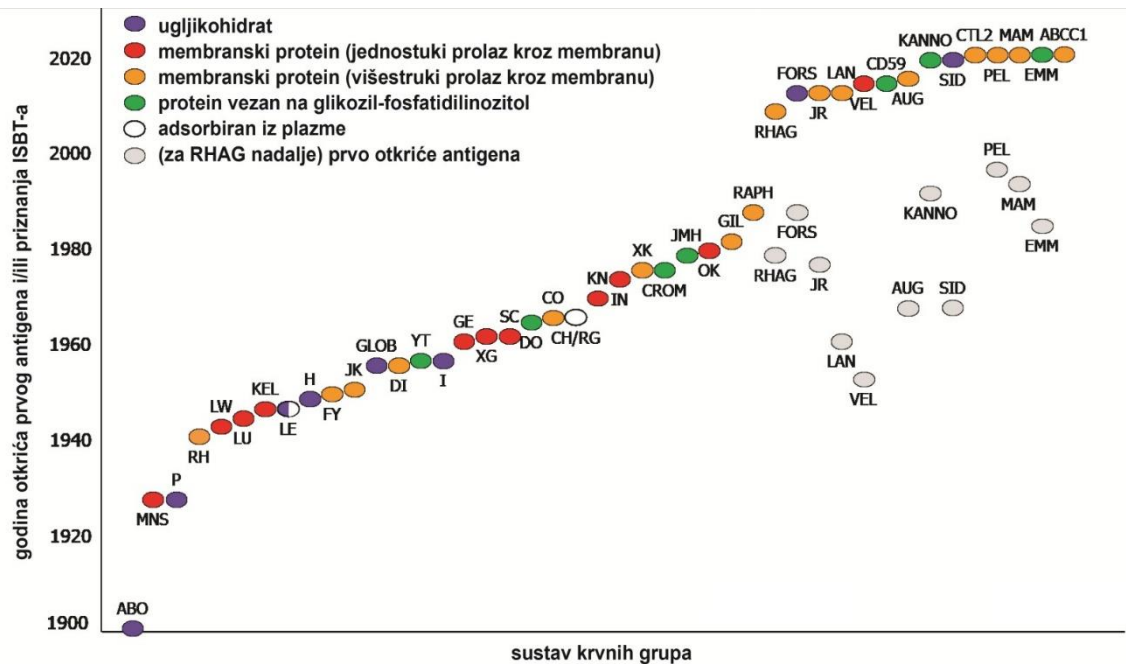
Radna skupina za imunogenetiku eritrocita i nazivlje krvnih grupa (engl. *Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party*) Međunarodnog udruženja za transfuziju krvi (engl. *International Society of Blood Transfusion*, ISBT) definira sustav krvne grupe kao jedan ili više antigena na ili u membrani eritrocita, koji nastaju kao produkt jednog genskog lokusa ili dvaju ili više vrlo usko povezanih homolognih gena između kojih nema rekombinacijskih događaja ili ih postoji vrlo malo [1]. Antigeni krvnih grupa po kemijskom sastavu mogu biti proteini, ugljikohidrati, glikoproteini ili glikolipidi, pri čemu su za ugljikohidratne antigene ili njihove dijelove produkti gena koji kontroliraju ekspresiju tih antigena odgovarajuće glikozil-transferaze [2]. Antigeni moraju biti definirani serološki, specifičnim protutijelima [1].

U posljednjem izvještaju Radne skupine od 30. lipnja 2021. godine definirana su 43 sustava krvnih grupa s ukupno 345 eritrocitnih antigena, kodiranih s 48 genskih lokusa (u pet sustava krvnih grupa antigeni su kodirani dvama genskim lokusima) [3,4] te ukupno više od 1800 alela [5].

Dodatna 33 antigena, koja (još) nisu uključena u sustave krvnih grupa, ISBT je svrstao u tri kategorije [1]:

1. skupine (engl. *collections*) – antigeni neutvrđene genske osnove (14 antigena),
2. serija 700 – antigeni niske učestalosti, učestalost manja od 1 % u svim populacijama (16 antigena),
3. serija 901 – antigeni visoke učestalosti, učestalost veća od 99 % u svim populacijama (3 antigena).

Vremenska crta otkrića prvog antigena ili službenog priznanja pojedinog sustava krvnih grupa prikazana je na Slici 1. Prvi definirani sustav krvnih grupa bio je ABO. Otkrio ga je Karl Landsteiner 1900. godine [6]. Posljednjih pet dosad otkrivenih sustava – CTL2, PEL, MAM, EMM i ABCC1 – definirani su 2020. godine [3].



**Slika 1.** Vremenska crta otkrića ili priznanja pojedinih sustava krvnih grupa od 1900. do 2020. godine. Prilagođeno prema [5] i [7] te popisu sustava krvnih grupa ISBT-a [3].

## 1.1. Sustav krvnih grupa Rh

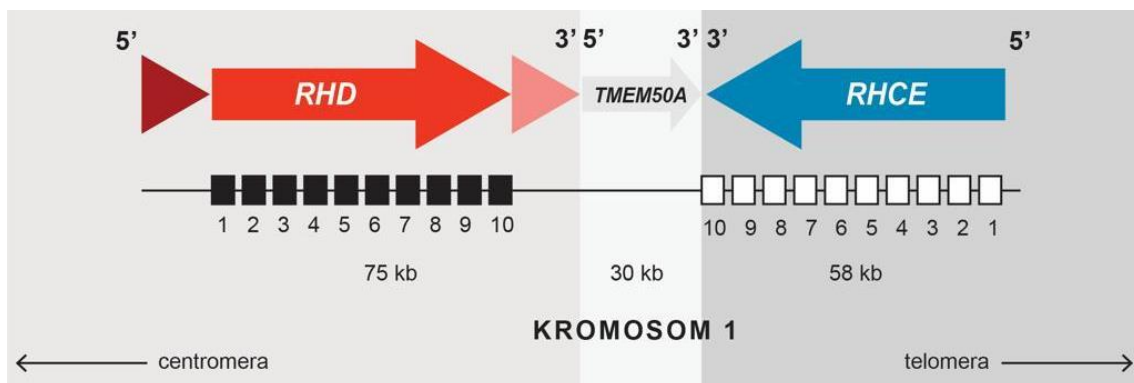
### 1.1.1. Haplotip, genotip, fenotip i nomenklatura sustava Rh

Sustav krvnih grupa Rh, simbola RH, nosi oznaku 004 po nomenklaturi ISBT-a, jer je bio definiran četvrti po redu (Slika 1) [3]. To je najkompleksniji sustav krvnih grupa, klinički najznačajniji nakon sustava krvnih grupa ABO. Danas uključuje 56 antigena označenih od RH1 do RH63, uz sedam oznaka koje više nisu u upotrebi [4]. *In situ* hibridizacija i analiza somatskih staničnih hibrida pokazale su da je sustav Rh smješten na kraćem kraku kromosoma 1, na kromosomskom lokusu 1p36.11 [8,9].

Prvi otkriveni i klinički najvažniji antigen jest antigen D (RH1). Nalazi se u eritrocitima oko 85 % osoba populacija europskog porijekla, a češći je u populacijama afričkog ili azijskog porijekla [10]. Većina ljudi serološki se može definirati kao D-pozitivni (D+) ili D-negativni (D-), no postoje i varijante sa slabom ili parcijalnom ekspresijom antigena D. Osobe D-negativnog fenotipa nemaju funkcionalni protein RhD u membranama eritrocita (najčešće kao posljedicu delecije gena *RHD* na oba homologna kromosoma 1) ili imaju neku varijantu gena *RHD* koja je neaktivna ili dovodi do ekspresije neaktivnog proteina [11].

Antigene sustava Rh kodiraju dva homologna i povezana gena (Slika 2, Tablica 1) [10]:

- Gen *RHD* kodira protein RhD (CD240D), odnosno antigen D (oznaka ISBT-a RH1). Alel *RHD* koji kodira standardni antigen D označava se s *RHD\*01*.
- Gen *RHCE* kodira protein RhCE (CD240CE), koji sadrži gensku informaciju za većinu antigena sustava Rh, od kojih su četiri klinički posebno značajna: C (RH2) i c (RH4) te E (RH3) i e (RH5). Četiri su glavna alela gena *RHCE*: *RHCE\*01* (*RHCE\*ce*), *RHCE\*02* (*RHCE\*Ce*), *RHCE\*03* (*RHCE\*cE*) i *RHCE\*04* (*RHCE\*CE*).



**Slika 2.** Smještaj i struktura gena sustava Rh na kraćem kraku kromosoma 1, uz gen *TMEM50A* između *RHD* i *RHCE*. Smjer strelice jest orijentacija 5'→3'. Numerirani pravokutnici označavaju egzone. Homologne sekvence susjedne genu *RHD*, Rh-okviri, označeni su trokutima. Izvori podataka [10,12].

**Tablica 1.** Geni sustava Rh i aleli koji kodiraju pet klinički najznačajnijih antigena s polimorfizmima odgovornim za njihovu ekspresiju.

Gen	Alel		Klinički najznačajniji antigen(i)	Polimorfizam					
	Nomenklatura ISBT-a	Alternativna nomenklatura		c.	48	178	203	307	676
<i>RHD</i>	<i>RHD*01</i>	-	D	Egzon	1	2	2	2	5
				p.	16	60	68	103	226
<i>RHCE</i>	<i>RHCE*01</i>	<i>RHCE*ce</i>	c e	c.	G	A	G	T	G
				p.	Trp	Ile	Ser	Ser	Ala
	<i>RHCE*02</i>	<i>RHCE*Ce</i>	C e	c.	C	A	G	T	G
				p.	Cys	Ile	Ser	Ser	Ala
	<i>RHCE*03</i>	<i>RHCE*cE</i>	c E	c.	G	C	A	C	C
				p.	Trp	Leu	Asn	Pro	Pro
	<i>RHCE*04</i>	<i>RHCE*CE</i>	C E	c.	C	A	G	T	C
				p.	Cys	Ile	Ser	Ser	Pro

c. redni broj nukleotida u sekvenci gena, p. redni broj aminokiseline u antigenu. Polimorfizmi u egzonima 1 i 2 gena *RHCE* sudjeluju u ekspresiji antigena C i c, a polimorfizam u egzonu 5 u ekspresiji antigena E i e. Izvori podataka: baze alela Rh ISBT-a [11,13] i baza sekvenci GenBank, RefSeq NG\_007494.1 [14].

Službenu (numeričku) nomenklaturu alela sustava krvnih grupa, pogodnu za pohranu u bazama podataka, utvrdio je ISBT te je stalno ažurira i unapređuje [15]. Ta nomenklatura nije u potpunosti zaživjela u rutinskom radu poput nomenklature alela glavnog sustava tkivne podudarnosti, sustava HLA (engl. *human leukocyte antigens*), koja je bila model za numeričku nomenklaturu [16]. Alternativnu nomenklaturu, koja odgovara povijesnim nazivima alela, poznatijima i popularnijima u struci, ISBT preporučuje u situacijama kad je numerička nomenklatura teško razumljiva [1,15].

Serološkim metodama mogu se definirati fenotipovi antigena sustava Rh, a molekularnim metodama moguće je definirati polimorfizme odgovorne za njihovu ekspresiju. U oba slučaja dobiveni rezultat naziva se fenotipom, koji se označava kombinacijom dokazanih antigena (ili specifičnih polimorfizama), na primjer DCcee. U stručnoj se javnosti pod nazivom Rh-fenotip smatra ekspresija antigena D, C, c, E i e. Haplotip čine aleli definirani s barem dva ili više genskih lokusa koji se nasljeđuju zajedno na istom kromosomu. Genotip čine oba haplotipa, pri čemu je jasno koji su geni vezani na svakom od homolognih kromosoma. U transfuzijskoj medicini pojam haplotipa u sustavu Rh upotrebljava se radi uvažavanja haploidne strukture sustava Rh. Podrazumijeva se da većina D-negativnih haplotipova sadrži samo jedan gen (*RHCE*), poput haplotipa *dce*. Postoji osam različitih haplotipova gena *RHD* i *RHCE*, svaki s različitom učestalošću u pojedinoj populaciji (Tablica 2). Isti haplotipovi imaju različitu učestalost u različitim populacijama [17]. Između populacija europskog porijekla malo je razlika, *dce* je rjeđi, a *DcE* nešto češći na jugu Europe nego na sjeveru. Glavni haplotip u populacijama afričkog porijekla jest *Dce*. U populacijama istočne Azije, područjima uz Tih ocean i u autohtonog stanovništva obiju Amerika haplotipovi bez antigena D rijetki su ili ih uopće nema [10].

**Tablica 2.** Haplotipovi gena sustava Rh s učestalosti u trima populacijama europskog, afričkog i azijskog porijekla, uz Wienerovu i nomenklaturu Fisher-Racea. Prilagođeno prema [10].

Haplotip		Učestalost, %		
Wienerova nomenklatura	Nomenklatura Fisher-Racea	Engleska	Nigerija	Hong Kong (Kina)
R <sup>1</sup>	<i>DCe</i>	42,05	6,02	72,98
r	<i>dce</i>	38,86	20,28	2,32
R <sup>2</sup>	<i>DcE</i>	14,11	11,51	18,70
R <sup>0</sup>	<i>Dce</i>	2,57	59,08	3,34
r <sup>''</sup>	<i>dcE</i>	1,19	0	0
r <sup>'</sup>	<i>dCe</i>	0,98	3,11	1,89
R <sup>z</sup>	<i>DCE</i>	0,24	0	0,41
r <sup>y</sup>	<i>dCE</i>	0	0	0,36

Antigeni C i c te E i e dva su para antitetičkih antigena, a posljedica su polimorfizama na proteinu RhCE kodiranih genom *RHCE* (Tablica 1). Rekombinacija između sekvenci DNA odgovornih za ekspresiju antigena D te parova C/c i E/e nije utvrđena, osim pri nastanku rijetkih hibridnih alela. Stoga se aleli nasljeđuju kao vezani geni, odnosno jedinstveni haplotipovi, koji se prema alternativnoj (tzv. CDE) nomenklaturi označavaju prema antigenima koje kodiraju (*DCe*, *DcE*, *dce*, itd.) [10,11]. Alternativna nomenklatura proizlazi iz izvorne teorije Fisher-Racea o tri gena, koja se suštinski pokazala netočnom, no nomenklatura je prihvatljiva zbog u pravilu nepostojeće rekombinacije između gena sustava Rh [18]. Još jedna davna teorija do danas se pokazala netočnom (Wiener), o alelima jednog gena, gdje svaki alel kodira aglutinogen (antigen) sastavljen od nekoliko seroloških determinanti. Wienerov pojam „alel“ zapravo označava haplotip *RHD-RHCE* pa je nomenklatura i dalje prisutna u struci [10]. Obje nomenklature za haplotipove prikazane su u Tablici 2. Prema nomenklaturi Fisher-Racea, D, C/c i E/e smatrali su se genima, pa su simboli uvijek pisani u kurzivu, što je i dalje pravilo za haplotipove. Danas, nakon definiranja stvarne genske osnove sustava Rh, ISBT je dopušta kao alternativnu nomenklaturu jer se široko upotrebljava u struci te se njome jasno mogu iskazati rezultati i interpretacija većine seroloških reakcija. Pritom oznaka *d* podrazumijeva deleciju gena *RHD* ili neaktivan *RHD*, a ne neki recesivni produkt alela *RHD*. Geni sustava Rh imaju kodominantnu ekspresiju prema Mendelovu nazivlju [1,15].

Genotip se zapisuje u obliku dvaju haplotipova odvojenih kosom crtom. Stvarni genotip piše se kurzivom ako je dokazan analizom obiteljskog stabla ili molekularnim testiranjem. Pretpostavljeni genotip dopušten je na temelju učestalosti u odgovarajućoj populaciji, no u tom se slučaju ne smije pisati u kurzivu [10].

U Tablici 3 navedeno je svih 36 mogućih genotipova koji nastaju kombinacijom osam haplotipova. Brojka 36 proizlazi iz jednadžbe za ukupan broj genotipova (*N*) od *n* različitih alela (ovdje haplotipova) za populacije u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži:

$$N = \frac{n(n + 1)}{2}$$

Serološki (protutijelima) moguće je razlikovati samo 18 fenotipova, zbog nemogućnosti razlikovanja homozigota od hemizigota za lokus *RHD* te, u hemizigota *RHD*, *cis*- ili *trans*-pozicije polimorfizama pojedinih antigena na proteinu RhCE iz iste skupine antitetičkih antigena u situacijama kad su oni različiti (na primjer C i c ili E i e) [10].

**Tablica 3.** Pregled svih genotipova u sustavu Rh s pripadajućim fenotipovima koje kodiraju te njihovoj učestalosti u engleskoj populaciji. Prilagođeno prema [10].

Redni broj genotipa	Antigeni sustava Rh					Fenotip	Genotip	Učestalost %
	D	C	c	E	e			
<b>RhD pozitivan fenotip</b>								
1								
2	+	+	-	-	+	DCCee	<i>DCE/DCE</i>	17,68
							<i>DCE/dCE</i>	0,82
3								
4	+	-	+	+	-	DccEE	<i>DcE/DcE</i>	1,99
							<i>DcE/dcE</i>	0,34
5								
6	+	-	+	-	+	Dccee	<i>Dce/dce</i>	2,00
							<i>Dce/Dce</i>	0,07
7								
8	+	+	-	+	-	DCCEE	<i>DCE/DCE</i>	< 0,01
							<i>DCE/dCE</i>	< 0,01 *
9								
10	+	+	+	-	+	DCcee	<i>DCE/dce</i>	32,68
							<i>DCE/Dce</i>	2,16
11							<i>Dce/dCE</i>	0,05
12							<i>DcE/dce</i>	10,97
13	+	-	+	+	+	DccEe	<i>DcE/Dce</i>	0,73
14							<i>Dce/dcE</i>	0,06
15							<i>DCE/DCE</i>	0,20
16	+	+	-	+	+	DCCEe	<i>DCE/dCE</i>	< 0,01
17							<i>DCE/dCE</i>	< 0,01 *
18							<i>DcE/DCE</i>	0,07
19	+	+	+	+	-	DCcEE	<i>DCE/dce</i>	< 0,01
20							<i>DcE/dCE</i>	< 0,01 *
21							<i>DCE/dce</i>	11,87
22							<i>DCE/dcE</i>	1,00
23	+	+	+	+	+	DCcEe	<i>DcE/dce</i>	0,28
24							<i>DCE/dce</i>	0,19
25							<i>Dce/DCE</i>	0,01
26							<i>Dce/dCE</i>	< 0,01 *
<b>RhD negativan fenotip</b>								
27	-	+	-	-	+	dCCee	<i>dCE/dce</i>	0,01
28	-	-	+	+	-	dccEE	<i>dcE/dcE</i>	0,01
29	-	-	+	-	+	dccee	<i>dce/dce</i>	15,10
30	-	+	-	+	-	dCCEE	<i>dCE/dCE</i>	< 0,01 *
31	-	+	+	-	+	dCcee	<i>dCE/dce</i>	0,76
32	-	-	+	+	+	dccEe	<i>dcE/dce</i>	0,92
33	-	+	-	+	+	dCCeE	<i>dCE/dCE</i>	< 0,01 *
34	-	+	+	+	-	dCcEE	<i>dcE/dCE</i>	< 0,01 *
35							<i>dCE/dce</i>	0,02
36	-	+	+	+	+	dCcEe	<i>dCE/dce</i>	< 0,01 *

\* iznimno rijedak genotip

Za samo 8 od 18 fenotipova vrijedi bijektivan odnos s genotipom koji ga kodira (genotipovi 27 – 34, Tablica 3). Ostalih 10 fenotipova nastaje ekspresijom dvaju, triju ili šest genotipova. U tim situacijama pretpostavljeni genotip ima svoju ulogu i kliničku važnost, pri čemu treba voditi računa o učestalosti haplotipova u populaciji. Na primjer (genotipovi 12 – 14), oko 15 puta je vjerojatnije da će osoba iz Engleske fenotipa DccEe imati genotip *DcE/dce* nego *DcE/Dce* te oko 180 puta vjerojatnije nego *Dce/dcE*, stoga je njezin pretpostavljeni genotip *DcE/dce*. U populacijama afričkog porijekla haplotip *Dce* češći je od *dce* pa je pretpostavljeni genotip osobe istog fenotipa (DccEe) *DcE/Dce*.

Postoje iznimno rijetke varijante gena *RHD* i *RHCE* s neuobičajenom ekspresijom jednog ili više antigena. Ti rjeđi haplotipovi mogu eksprimirati jedan ili više specifičnih antigena niske učestalosti (engl. *low frequency antigens*) te u homozigota mogu uzrokovati izostanak antigena visoke učestalosti (engl. *high frequency antigens*). Neuobičajena ekspresija antigena D ili C/c i E/e najčešće je uzrokovana pogrešnim mutacijama (engl. *missense mutation*) u genu *RHD* odnosno *RHCE*, a često uključuje i izmjenu genetičkog materijala između oba gena (konverzija gena) [10].

### 1.1.2. Protein RhAG

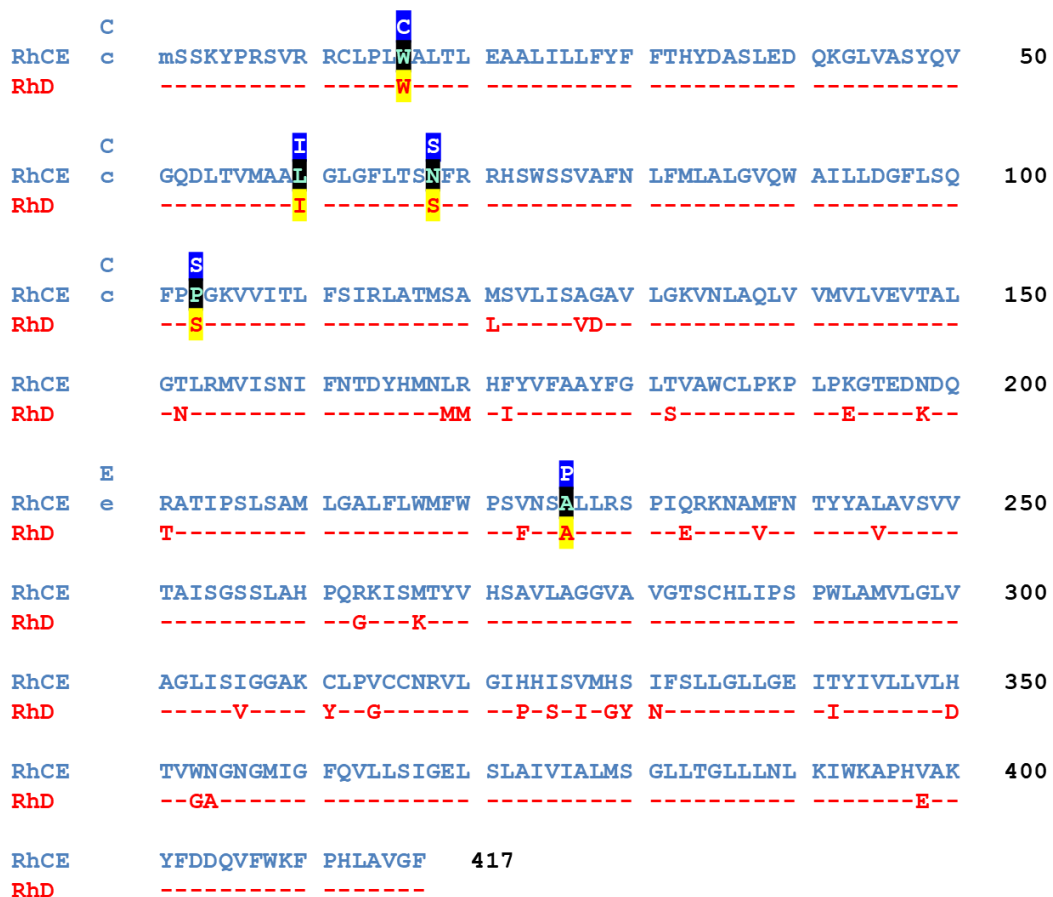
RhAG (CD241) je protein bez kojeg nema ekspresije nijednog antigena sustava Rh. Naziv je akronim od engl. *Rh-associated glycoprotein* (glikoprotein povezan s Rh). Protein RhAG sadrži antigene sustava krvnih grupa RHAG. Struktura gena koji ga kodira, *RHAG*, slična je genima sustava Rh uz velik postotak homologije. Zbog toga i struktura proteina RhAG slična je RhD i RhCE s dvanaest membranskih domena [19]. Njegova prisutnost u membrani nužna je za ekspresiju antigena D, C/c i E/e. Eritrociti s rijetkim fenotipom Rh<sub>null</sub> ne pokazuju ekspresiju nijednog antigena sustava Rh. Fenotip Rh<sub>null</sub> može imati dva različita genska uzroka: homozigotnost za deleciju gena *RHD* s inaktivnim genom *RHCE* ili homozigotnost za inaktivirajuće mutacije u genu *RHAG* (kad ne postoji ekspresija bilo kojeg od prisutnih i funkcionalnih gena *RHD* i/ili *RHCE*) [20].

U membrani eritrocita proteini RhAG, RhD i RhCE povezani su u trimere: homotrimere proteina RhAG, heterotrimere s proteinom RhAG i po dva proteina RhD ili RhCE. Heterotrimer sastavljen od svakog od tri proteina nije pronađen [21-23]. Ta tri proteina dio su makrokompleksa stanične membrane eritrocita s tetramerima proteina vrpca 3 (engl. *band 3*) koji sadrži sustav krvnih grupa Diego. Ostale članove kompleksa čine glikoprotein ICAM-4 (sustav krvnih grupa Landsteiner-Wiener), glikoforini A i B (sustav krvnih grupa MNS) te CD47. Kompleks je vezan na citoskelet eritrocita vezanjem proteina vrpca 3 na ankirin R i protein 4.2 [20].

Homolozi proteina RhAG, RhBG i RhCG nalaze se u ljudi u neeritroidnim stanicama. Ljudska obitelj gena Rh tako sadrži pet proteina koji su kodirani genima *RHD*, *RHCE* i *RHBG* s kromosoma 1, *RHAG* s kromosoma 6 i *RHCG* s kromosoma 15 [24].

### 1.1.3. Biokemija proteina i funkcija antigena sustava Rh

Proteini RhD i RhCE izrazito su hidrofobni. Prolaze kroz membranu eritrocita dvanaest puta, stvarajući šest izvanstaničnih petlji (domena), a N- i C-krajevi obaju proteina nalaze se u citoplazmi s konzerviranim sekvencama aminokiselina (Slika 3). Oba su proteina palmitoilirana, a ne glikozilirana ili fosforilirana, što su inače uobičajene postranslacijske modifikacije većine proteina na površini stanica u sisavaca [25-27]. Palmitinska kiselina veže se tioesterskom vezom na ostatke Cys smještenih blizu citoplazmatskog dijela lipidnog dvosloja. Protein RhD ima pet, a protein RhCE šest ostataka Cys, od kojih dva u RhD i tri u RhCE tvore motive Cys-Leu-Pro na mjestu ulaska proteina u citoplazmatski dio lipidnog dvosloja. Ti motivi vjerojatno označavaju glavna mjesta za vezanje palmitinske kiseline koja ima funkciju u održavanju tercijarne strukture proteina [28,29].

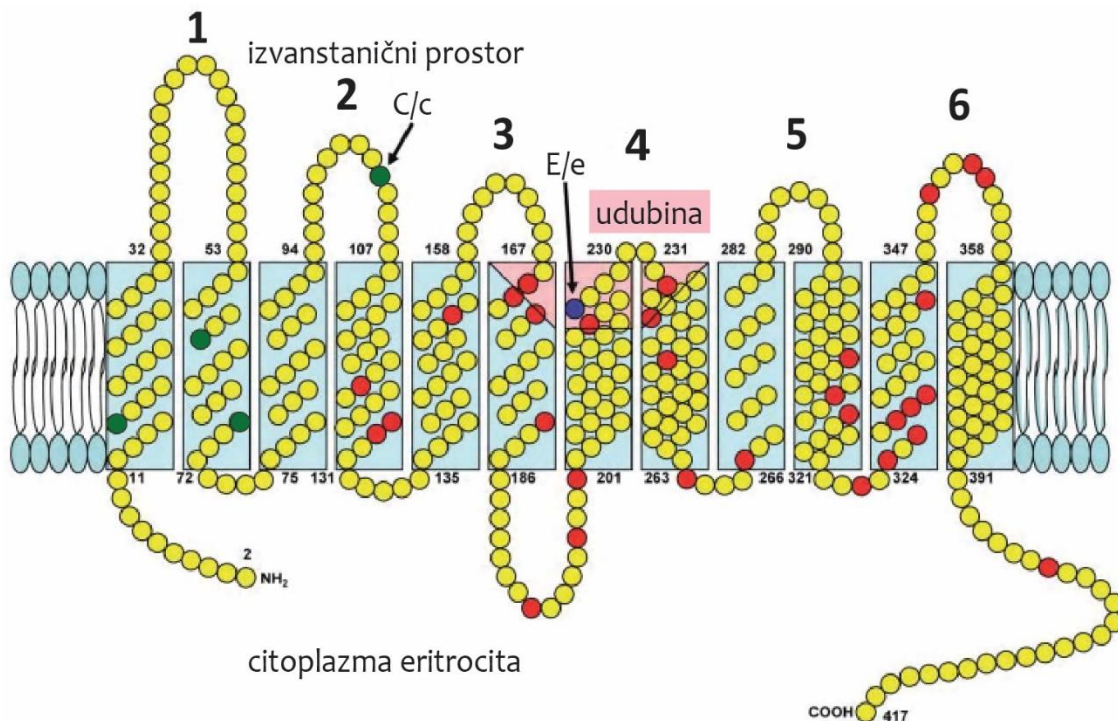


**Slika 3.** Slijed aminokiselina u proteinima RhCE i RhD. Polimorfizam za antigene C/c i E/e prikazan je iznad osnovne sekvence (antigeni C, E) ili u njezinoj ravnini (antigeni c, e). U sekvenci proteina RhD znak „-“ označava podudarnost s proteinom RhCE, dok su razlike u sekvenci u odnosu na RhCE prikazane simbolom aminokiseline. Obojene aminokiseline prikazuju razlike na mjestima polimorfizama C/c i E/e, a bojom neoznačene aminokiseline u sekvenci proteina RhD prikazuju preostale razlike u sekvencama dvaju proteina. Izvori: [10,30-32] i RefSeq NG\_007494.1 [14].



Proteini RhD i RhCE razlikuju se u 32 do 35 aminokiselina ovisno o alelu *RHCE* (slike 3 i 4, Tablica 1). Iako otvoreni okviri čitanja cDNA gena *RHD* i *RHCE* kodiraju polipeptide od po 417 aminokiselina, za konačni protein N-terminalni metionini (mjesto početka translacije u mRNA) izrezuju se posttranslacijskom modifikacijom [30,31].

Modeliranja homologije temeljena na kristalnim strukturama bakterijskih homologa proteina sustava Rh i neeritroidnom homolognom glikoproteinu RhCG u ljudi podupiru model s dvanaest membranskih domena i šest izvanstaničnih petlji (Slika 4) [21-23]. Taj model predviđa prisutnost izvanstanične udubine (engl. *vestibule*) u području 3. i 4. izvanstanične petlje te 6., 7. i 8. membranske domene (kodirane egzonima 4 i 5 gena *RHD*) (Slika 5). Moguće je da udubina prolazi kroz staničnu membranu te se pretpostavlja da omogućuje pristup IgG protutijelima anti-D [21,33,34]. Kako bi se konačno definirala struktura proteina RhD, danas se stvaraju računalni modeli i algoritmi koji uporabom trodimenzionalnih intraproteinskih interakcija nastoje predvidjeti imunizacijski potencijal svakog, pa i novootkrivenog, alela *RHD* [35,36].



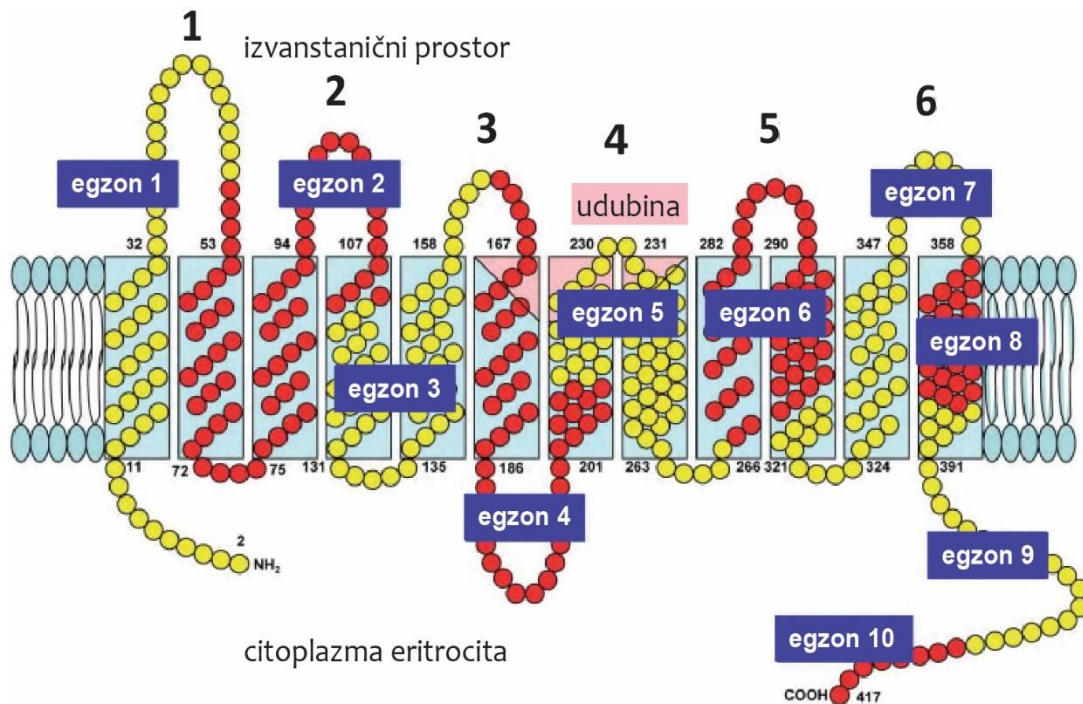
**Slika 4.** Vjerojatna struktura proteina RhD i RhCE unutar stanične membrane eritrocita. Model prikazuje dvanaest membranskih domena, citoplazmatske N- i C-krajeve, šest izvanstaničnih petlji (numerirane su) te izvanstaničnu udubinu (ružičasti trapez). Crveno označene aminokiseline mjesta su razlika u sekvencama RhD i RhCE, zeleno mjesta polimorfizama antigena C i c, a ljubičasto antigena E i e. Pretpostavljene najvažnije aminokiseline antigena C/c i E/e za pristup protutijelima označene su strelicom. Prilagođeno prema [10,34].

Ekspresija antigena sustava Rh utvrđena je isključivo u eritrocitima. Nisu pronađeni u limfocitima, monocitima, granulocitima ni trombocitima, kao ni stanicama drugih tkiva [37,38]. Antigeni D, C, c i e dokazani su u fetalnim eritrocitima u osmom tjednu trudnoće. Nalaze se i u eritrocitima krvi iz pupkovine, što nije iznenađujuće s obzirom na njihovu ulogu u hemolitičkoj bolesti fetusa i novorođenčadi, HBFN (engl. *hemolytic disease of fetus and newborn, HDFN*) [39].

Proteini sustava Rh slične su strukture s citoplazmatskim N- i C-krajevima kao i membranski transporteri. Osnovna funkcija eritrocita jest prijenos respiratornih plinova. Stoga je moguće, da se proteini sustava Rh, kao jedni od najučestalijih proteina u membrani eritrocita, uključe u brzi transport plinova u stanicu i iz nje, poput CO<sub>2</sub> ili O<sub>2</sub> (deoksihemoglobin/oksihemoglobin). Eritrociti mogu skladištiti i dušikov(II) oksid (NO) te njegovim otpuštanjem regulirati vazodilataciju. Postoje brojni dokazi da je funkcija proteina RhAG transport plinova, iako još nije u potpunosti potvrđen ligand (NH<sub>3</sub> ili NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) [10]. Koncentracija iona NH<sub>4</sub><sup>+</sup> u eritrocitima triput je veća nego u plazmi. Čini se da RhAG sudjeluje u transportu iona NH<sub>4</sub><sup>+</sup> eritrocitima u jetru ili bubrege, kako bi ga izbacio iz tijela, štiteći tako mozak i druge organe od toksičnosti iona NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [40]. Nasuprot tomu, gotovo je sigurno da proteini sustava Rh nisu membranski transporteri, ali njihova funkcija i dalje je nepoznata. Postoji nekoliko teorija: da su uključeni u kretanje plinova povećanjem omjera površine i volumena eritrocita [41] ili da služe za prihvat na mrežu citoskeleta preko interakcija citoplazmatskog C-kraja vrlo konzervirane sekvence s adapterskim proteinom ankirin R i tako doprinose strukturi membrane eritrocita [20]. Tu posljednju teoriju dokazuju neuobičajeno oblikovani eritrociti rijetkog fenotipa Rh<sub>null</sub> (bez proteina RhD, RhCE i RhAG), dok samo RhD negativne ili samo RhCE negativne osobe imaju eritrocite normalnog oblika [20].

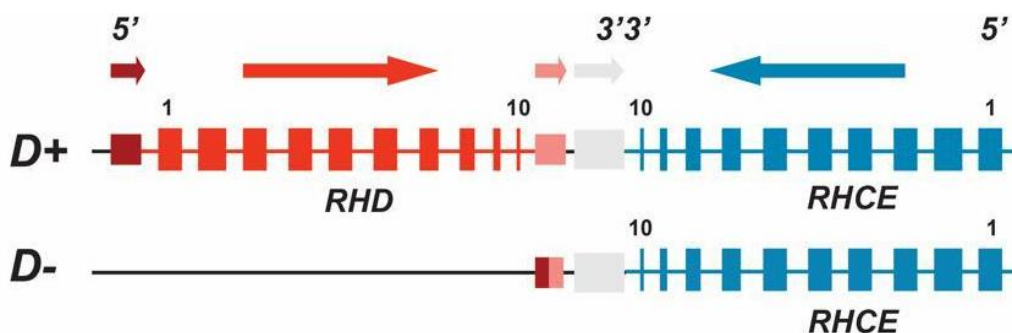
#### 1.1.4. Molekularna genetika gena sustava Rh

Geni *RHD* i *RHCE* imaju gotovo jednaku strukturu. Svaki se sastoji od deset egzona, od kojih je prvih sedam izrazito dulje od posljednja tri [42,43]. Slika 5 prikazuje koji egzoni kodiraju pojedina područja proteina prema modelu dvanaest membranskih domena. Geni *RHD* i *RHCE* homologni su u 93,8 % ukupne sekvence introna i kodirajućih egzona te u 97,3 % kodirajuće sekvence. Najveća je razlika u intronu 4, gdje *RHCE* ima inserciju duljine oko 600 pb u odnosu na *RHD*. Otkrivene su i četiri druge intronske insercije ili delecije duljine od oko 100 pb, poput insercije u intronu 2 gena *RHCE* od 109 pb [12].



**Slika 5.** Model proteina RhD i RhCE u staničnoj membrani eritrocita s različito obojenim regijama ovisno o egzonu gena koji kodira pojedinu regiju. Prilagođeno prema [10].

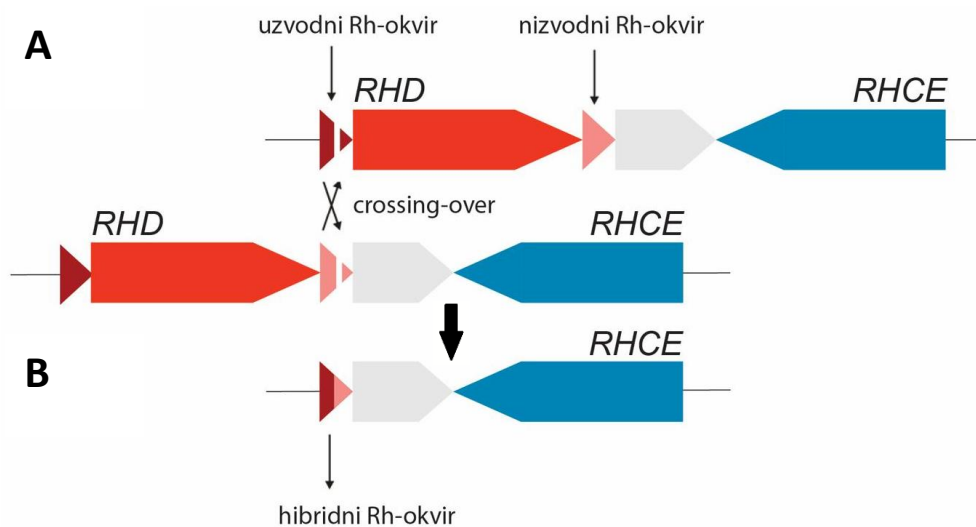
Gen *RHD* veličine je 57 295 pb, gen *RHCE* 57 831 pb, a između njih je dio genoma duljine oko 30 kb s genom *TMEM50A* (Slika 6) [44]. Geni *RHD* i *RHCE* u suprotnoj su orijentaciji, neuobičajeno za gene u grupi (engl. *cluster genes*), što prikazuju slike 2 i 6 [9,44]. Početak transkripcije gena *RHCE* nalazi se 83 pb uzvodno od početnog kodona za translaciju. U susjednim regijama gena *RHD* i *RHCE* u smjeru 5' nalaze se vezna mjesta transkripcijskih faktora s važnom funkcijom u ekspresiji gena sustava Rh [43].



**Slika 6.** Organizacija gena sustava Rh u tipičnim D-pozitivnim (D+, gore) i D-negativnim (D-, dolje) haplotipovima. Gen *RHD* (crveno), omeđen s dvije homologne sekvence Rh-okvira (uzvodni okvir tamnocrven, nizvodni okvir svjetlocrven) i susjedni gen *TMEM50A* (sivo, neobilježen na slici) nalaze se u orijentaciji 5'→3', a gen *RHCE* (plavo) u orijentaciji 3'→5'. RhD negativan haplotip na slici čine delecija gena *RHD* i sekvenca hibridnog okvira. Pravokutnici unutar gena prikazuju egzone, numerirani su prvi (1) i posljednji (10). Prilagođeno prema [10].

Geni sustava Rh podložni su različitim rekombinacijama kojima nastaju različiti genski rearanžmani, molekularna osnova brojnih fenotipova, odnosno raznih antigena sustava Rh. Mehanizmi nastanka genskih rearanžmana između blisko povezanih homolognih gena mogu biti neregipročni crossing-over ili konverzija gena [44-47].

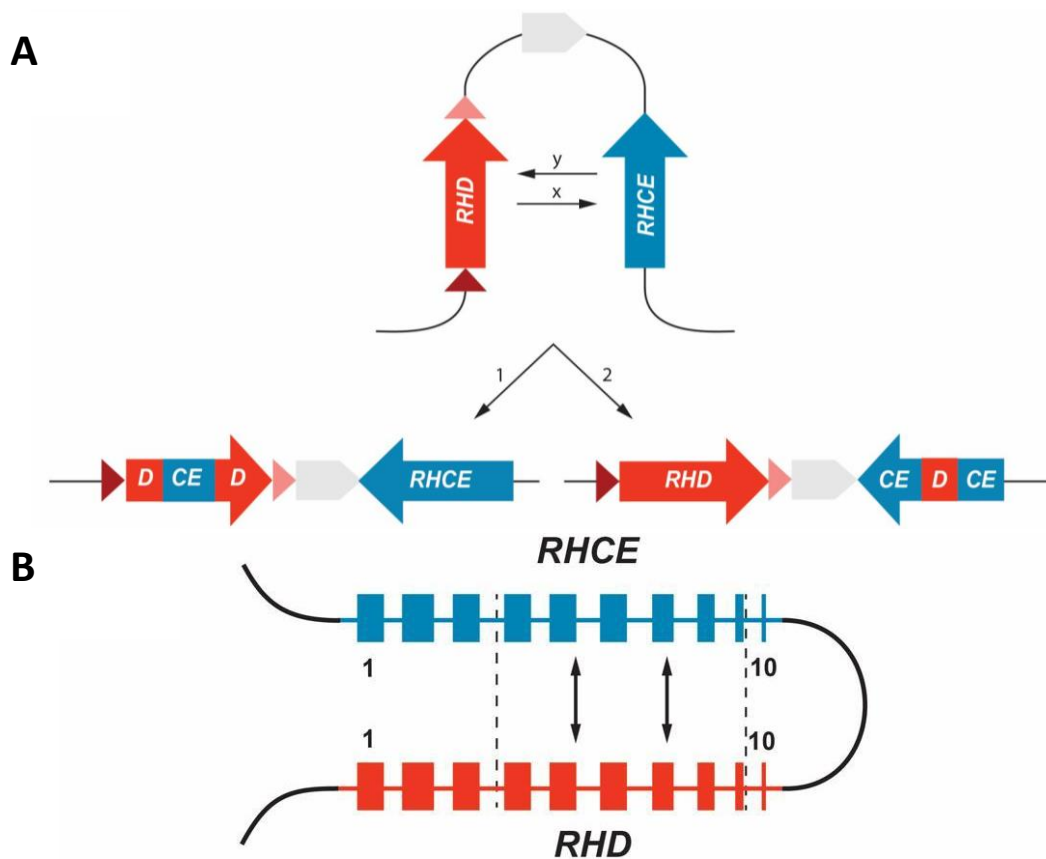
Uzrok nastanka RhD negativnog fenotipa delecijom gena *RHD* jest neregipročni crossing-over između homolognih kromosoma s genskim lokusom *RHD* (Slika 7) [44].



**Slika 7.** Pretpostavljeni mehanizam nastanka delecije gena *RHD* u osoba RhD negativnog fenotipa. (A) Crossing-over između homolognih kromosoma na kojima se nalazi genski lokus *RHD*. Bijeće linije u uzvodnom i nizvodnom Rh-okviru predstavljaju područje od 903 pb sa 100 % homolognim sekvencama unutar područja identiteta od 1463 pb. (B) Konačni produkt crossing-overa, DNA s delecijom gena *RHD* i sekvencom hibridnog okvira. Prilagođeno prema [44].

Konverzija gena jest neregipročna zamjena genskog materijala odsječka jednog homolognog gena ekvivalentnim odsječkom njegova homologa. Dominantni je mehanizam nastanka hibridnih alela struktura *RHD-CE-D* i *RHCE-D-CE*. Vjerojatnost za dva crossing-overa u takvoj blizini mala je pa je konverzija gena vjerojatnije objašnjenje pojave hibridnih alela u sustavu Rh [45]. Geni *RHD* i *RHCE* suprotne su orijentacije, što dodatno smanjuje mogućnost za neregipročni crossing-over. Stoga je najvjerojatnija konverzija gena između para *RHD* i *RHCE* u *cis*-poziciji (Slika 8A) [46]. U hibridnih alela konverzija gena djeluje na dvije razine stvarajući kalupne mutacije (engl. *templated mutations*). Makrokonverzijski događaji stvaraju hibridni alel, čiji je znatni dio zamijenjen ekvivalentnim odsječkom homologa, a mikrokonverzijski događaji mogu rezultirati zamjenom jednog ili više manjih odsječaka, vrlo često i zamjenom samo

jednog nukleotida (Slika 8B). Nekalupne mutacije (engl. *untemplated mutations*), kod kojih nukleotidi nastale sekvence ne potječu ni od kojeg gena sustava Rh, nastaju pogrešnim mutacijama ili konverzijom gena. Nekalupne mutacije česte su u alelima *RHD* za antigene slabog fenotipa D. Pretpostavljena je struktura ukosnice (engl. *hairpin*) DNA kromosoma koja omogućuje istu orijentaciju i blizinu homolognih dijelova. Zbog toga je moguća konverzija gena u *cis*-poziciji [47].



**Slika 8.** (A) Vjerojatni mehanizam konverzije gena u paru lokusa *RHD* i *RHCE* u *cis*-poziciji. Geni *RHD* s Rh-okvirima i *RHCE* predstavljeni su strelicama sa smjerom orijentacije 5'→3'. U hibridnim alelima crveno je označena sekvenca koja potječe od gena *RHD*, a plavo od gena *RHCE*. (B) Detaljniji prikaz ukosnice. Crne okomite strelice pokazuju smjer nastanka hibridnih alela strukture *RHD-CE-D* (prema dolje) i strukture *RHCE-D-CE* (prema gore). Smjer strelice određuje gen (početak strelice) čiji će egzoni biti umetnuti u homologni gen (vrh strelice). Ilustracije su shematske i ne sadrže sve detalje, niti su prikazani elementi nužno u stvarnim omjerima dimenzija. Prilagođeno prema [45,46].

Vodoravne crne strelice između gena na Slici 8A označene s *x* i *y* predstavljaju smjer izmjene genskog materijala. Može doći do stvaranja hibridnog alela strukture *RHD-CE-D* (smjer 1, u sredini lijevo, ako smjer izmjene genskog materijala ide najprije strelicom *x* pa zatim strelicom *y*) ili hibridnog alela strukture *RHCE-D-CE* (smjer 2, u sredini desno,

ako smjer izmjene genskog materijala ide najprije strelicom *y* pa zatim strelicom *x*). U primjeru na Slici 8B isprekidane okomite linije ograničavaju područje izmjene genskog materijala. Gledano strelicama prema dolje, nastaje hibridni alel kojem su egzoni 4 do 9 gena *RHD* zamijenjeni egzonomima gena *RHCE*, strukture *RHD\*D-CE(4-9)-D* [45-46].

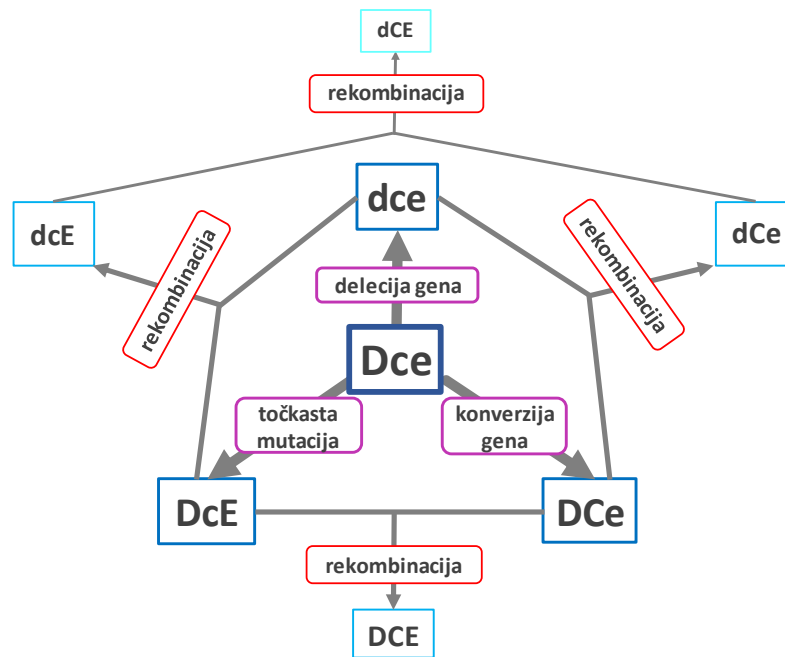
U ovoj su disertaciji izrazi „aleli *RHD*“ i „varijante gena *RHD*“ u pravilu istoznačnice, ovisno o kontekstu koji se želi naglasiti. U stručnoj se javnosti produkti alela *RHD* različiti od *RHD\*01* tradicionalno nazivaju D-varijantama. Da bi se nazivi povezali, aleli koji kodiraju D-varijante mogu se nazivati i varijantama gena *RHD*. Analogno nazivlje vrijedi i za izraze „aleli *RHCE*“, odnosno „varijante gena *RHCE*“ [10].

### 1.1.5. Evolucija gena sustava Rh

Geni sustava Rh evoluirali su najvjerojatnije iz prokariotskog gena *Amt*. Homolozi ljudskih gena sustava Rh rasprostranjeni su u beskralježnjaka i kralježnjaka, ali ih nema u biljaka. U kralježnjaka je došlo do diverzifikacije gena i obitelj gena Rh proširila se na četiri grupe (engl. *clusters*) paraloga. U ljudi su to geni sustava Rh (*RHCE* i *RHD*), *RHAG*, *RHBG* i *RHCG* [24]. Današnji geni sustava Rh nastali su, gotovo sigurno, duplikacijom gena sličnom današnjem genu *RHAG*. Analize brojnih sinonimnih i nesinonimnih supstitucija pokazuju da je prirodna selekcija djelovala na oba gena. Pritom je gen *RHAG* više konzerviran od gena sustava Rh te je evoluirao dva do tri puta sporije, što upućuje na veću funkcionalnu važnost gena *RHAG* [48].

Duplikacija gena sličnog genu *RHAG*, čime je nastao recentniji gen *RH*, dogodila se u kambriju prije 510 milijuna godina, prije divergencije riba beščeljusnica (*Agnatha*) i čeljustousnih kralježnjaka (*Gnathostomata*) [49]. Homolozi gena *RH* pronađeni su u svim proučavanih sisavaca [50]. Sekvence njihovih cDNA homologne su sa sekvencom čovjeka i predviđaju produkte od također 417 aminokiselina. Duplikacija davnog gena *RH*, koja je potaknula evoluciju *RHCE* i *RHD* u čovjeka, morala se dogoditi u zajedničkog pretka ljudi, čimpanzi i gorila prije osam do jedanaest milijuna godina [51]. Poput većine ljudi, i čimpanze i gorile imaju barem dva gena *RH*, iako neke čimpanze imaju i tri ili četiri gena; drugi primati imaju samo jedan gen *RH* po haploidnom genomu [52,53].

S obzirom na pozicije gena i orijentaciju, današnji gen *RHCE* vjerojatno je ishodišni gen *RH*. Serija genetičkih događaja stvorila je današnje haplotipove sustava Rh, što prikazuje Slika 9 [12, 54].



**Slika 9.** Genetički događaji koji su tijekom evolucije omogućili pojavu današnjih haplotipova sustava Rh. Izvori podataka: [12,51,54].

Nakon duplikacije ishodišnog gena *RHCE*, slijedila je divergencija zbog mutacija i kompleksnih rekombinacijskih događaja, kojima su nastali geni koji sliče genu *RHD* i alelu *RHCE\*01* (*\*ce*), iz kojih su nastali ostali haplotipovi prikazani na Slici 9. Haplotip *Dce* bio je time ishodište ljudskog sustava Rh. Delecija ili inaktivacija gena *RHD* stvorila je haplotip *dce* (slike 6 i 7), neregularna rekombinacija sekvenci gena *RHD* iz područja egzona 2 u gen *RHCE\*ce* mogla je stvoriti haplotip *DCe* (Slika 8), a točkasta mutacija (promjena jedne baze) na poziciji c.676 u genu *RHCE\*ce* mogla je stvoriti haplotip *DcE* (Tablica 1). Carritt i sur. predložili su da je haplotip *dCE* nastao rekombinacijom *DcE* i *dce*, haplotip *dcE* rekombinacijom *DcE* i *dce*, a haplotip *DCE* rekombinacijom *DcE* i *DcE* [51]. Vrlo rijedak haplotip *dCE* mogao je nastati rekombinacijom dvaju, također rjeđih, haplotipova *dCe* i *dcE* [12,51,54].

Delecija gena *RHD* kojom nastaje D-negativan haplotip, relativno čest u populacijama europskog porijekla, nije bila dio ishodišnog haplotipa, već se morala dogoditi tek nakon duplikacije i diverzifikacije gena *RH* [44]. Mehanizam prirodne selekcije u korist populacija u kojima su i D-pozitivni i D-negativni fenotipovi relativno česti nije do kraja razjašnjen. Taj je fenomen detaljno istraživao s obzirom na ulogu koju ti fenotipovi igraju u HBFN-u. Unatoč tomu, analizom genomskih podataka nisu dobiveni dokazi u prilog ikakvu učinku prirodne selekcije na deleciju gena *RHD* [55].

## 1.2. Varijante gena *RHD*

Polimorfizmi u genomu najčešće nemaju funkcionalni utjecaj na organizam. Genski produkti polimorfizama eritrocitnih krvnih grupa, međutim, mogu biti imunogeni u antigen-negativnih osoba pri imunizacijskim događajima (trudnoća, transfuzija eritrocita i transplantacija). Mnogo alela sustava Rh, a još više i drugih sustava krvnih grupa, ima promjenu u jednoj bazi (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) kao molekularnu osnovu polimorfizma u odnosu na standardne alele (u sustavu Rh to su *RHD\*01* te *RHCE\*01*, *\*02*, *\*03* i *\*04*). Taj je pojam povezan sa sustavima krvnih grupa u literaturi u posljednje vrijeme uobičajeno nazivati SNV (engl. *single nucleotide variant*). Slično je opisano i za antigene drugih stanica krvi, poput antigena HLA i trombocitnih antigena, HPA (engl. *human platelet antigens*) [10].

Od svih antigena sustava Rh najviše je imunogen antigen D, zbog čega je i klinički najvažniji. O tome svjedoči i činjenica da se kolokvijalno D-pozitivan i D-negativan fenotip često (netočno) označavaju kao Rh+ i Rh-. Oko 80 % zdravih RhD negativnih dobrovoljaca i 20 – 30 % RhD negativnih pacijenata koji su primili velike doze RhD pozitivne krvi stvaraju protutijelo anti-D [56-59]. Do uvođenja profilakse imunoglobulinom, protutijelo anti-D bilo je čest uzrok teškog oblika HBFN-a.

Oko 85 % stanovnika Europe ima standardni protein RhD u membranama eritrocita (D-pozitivni), a oko 14 % nema ga zbog delecije gena *RHD* (D-negativni). Oko 1 % čini heterogena populacija s varijantama gena *RHD* koje su različito kodirane uz ekspresiju različitih fenotipova [60]. U neuropskim populacijama antigen D ima oko 95 % pripadnika populacija afričkog porijekla. U populacijama istočne Azije antigen D jest antigen visoke učestalosti, s učestalosti do 100 % u nekim populacijama. Postoji znatan broj alela *RHD* koji kodiraju varijante antigena D, a neki aleli *RHD* uopće nemaju ekspresiju funkcionalnog antigena D [10,60].

### 1.2.1. Razvoj spoznaja o varijantama antigena D

Naziv D<sup>u</sup> za antigen D koji detektiraju samo neka protutijela anti-D potječe od Strattona iz 1946. godine [61]. Definicija je proširena na antigene D onih eritrocita koji ne aglutiniraju IgM, ali aglutiniraju IgG protutijelo anti-D u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT). Pojavom boljih reagenasa anti-D, većina eritrocita kojima bi ranije u



rutinskom testiranju bio određen D<sup>u</sup>, reagirala je uobičajeno. Tada se D<sup>u</sup> smatrala kvantitativnom varijantnom s razlikom od „običnog“ antigena D samo u broju antigenskih mjesta na eritrocitu [62,63]. Zbog toga je pojam D<sup>u</sup> devedesetih godina 20. stoljeća zamijenjen pojmom slabi D (engl. *weak D*) [64]. Definicija slabog antigena D često je ovisila o reagensu (protutijelima anti-D) te tehnici u serološkom testiranju pa je bilo teško odrediti stvarnu učestalost slabog D. Prema ranijim procjenama, učestalost slabog antigena D bila je od 0,3 % do 1,7 % [65].

Istovremeno je opisana i kvalitativna varijanta antigena D, dokazana u rijetkih D-pozitivnih osoba koje mogu stvoriti aloprotutijelo anti-D. Po tadašnjoj teoriji antigen D smatrao se mozaikom epitopa. Stoga bi osobe bez svih epitopa i uz izloženost „potpunom“ antigenu D mogle stvoriti protutijelo na epitope antigena D koje nemaju. Takve kvalitativne D-varijante stoga su nazvane parcijalni D (engl. *partial D*) [66].

Razvojem molekularnih metoda i njihovom prisutnosti u određivanju krvnih grupa drastično razgraničenje D-varijanti na kvantitativne (slabi D) i kvalitativne (parcijalni D) pokazalo se ne samo izlišnim, već i netočnim [10]. Međutim, podjela se toliko ukorijenila u transfuzijskoj medicini da se često upotrebljavala za donošenje odluke hoće li pacijent s D-varijantom primiti D-pozitivnu ili D-negativnu krv ili hoće li trudnica dobiti imunoglobulin anti-D nakon rođenja D-pozitivnog djeteta. Definicije tih pojmova bile su neprecizne, a nomenklatura za pojedine varijante često je bila zbunjujuća, nerijetko i kombinacija fenotipa i genotipa. Parcijalni antigeni D najčešće su nazivani različitim troslovnim kombinacijama ili oznakama kategorije (još jedan arhaizam). Nakon istraživanja Wagnera i sur. iz 1999. godine, slabi antigeni D označeni su brojkama od 1 do (tada) 81 [67].

Dvije tvrdnje i danas se nerijetko mogu pronaći u struci, no nijedna nije potpuno zadovoljavajuća.

Prva je tvrdnja da osobe s parcijalnim antigenima D mogu stvoriti protutijela nakon izloženosti standardnom antigenu D, a oni sa slabim antigenima D ne mogu. Problem s ovom definicijom jest to da se neka D-varijanta možda nazvala slabim umjesto parcijalnim D jer dotada nije pronađena osoba s tom D-varijantom koja je stvorila protutijelo anti-D. To ne znači da neka druga osoba s tom D-varijantom neće stvoriti protutijelo anti-D nakon transfuzije D-pozitivnih eritrocita ili trudnoće s D-pozitivnim djetetom [10].

Druga je tvrdnja da protein RhD ima aminokiseline u parcijalnim antigenima D koje se razlikuju od standardnog D u jednoj ili više predviđenih vanjskih petlji, dok slabi antigeni D imaju jednu ili više različitih aminokiselina unutar neke od dvanaest membranskih domena, šest citoplazmatskih petlji ili N- i C-krajeva (Slika 4). Bit je te tvrdnje da polimorfizmi slabih antigena D nisu u izvanstaničnom prostoru, gdje bi uzrokovali stvaranje protutijela. Problem je što nije poznata precizna struktura proteina RhD te posljedično lokacija aminokiselinskih ostataka u membrani. Molekularna dijagnostika *RHD*, koja jedina može razlikovati alele tih antigena, još uvijek se ne provodi rutinski u većem broju ustanova. Zato bi ta tvrdnja teško mogla koristiti u serološkom testiranju ako se ne zna točna pozicija polimorfizma u odnosu na standardni antigen D [10].

U posljednjih petnaestak godina zaključak je stručne javnosti da je stroga podjela i definicija slabih i parcijalnih antigena D umjetna, zastarjela i djelomično neodgovarajuća [68]. Nazivi i definicije slabih i parcijalnih antigena D trebali bi se napustiti i zamijeniti zbirnim pojmom – D-varijanta. U situaciji kad ne postoji međunarodno afirmirano nazivlje, dopušteno je služiti se starim nazivima [10,68].

### 1.2.2. Nomenklatura alela *RHD*

Radna skupina ISBT-a objavila je najnoviji popis alela *RHD* krajem 2021. godine [11]. Nešto ranije iste godine objavljena je i novi popis alela *RHCE* [13]. U popisu alela *RHD*, uz alel *RHD\*01* za standardni antigen D, sve su varijante gena *RHD* popisane u zajedničkoj tablici, odvojene po grupama prema fenotipu produkata (Slika 10).

<i>RHCE</i>			<i>RHD</i>	
ce	<i>RHCE*01</i> <i>RHCE*01.01</i> do <i>*01.44</i>	<i>RHCE*01N.01</i> do <i>RHCE*01N.13</i>	D-pozitivni	<i>RHD*01</i> i <i>RHD*01.01</i>
Ce	<i>RHCE*02</i> <i>RHCE*02.01</i> do <i>*02.40</i>	<i>RHCE*02N.01</i> do <i>RHCE*02N.14</i>	Parcijalni D	<i>RHD*02</i> do <i>RHD*66</i>
cE	<i>RHCE*03</i> <i>RHCE*03.01</i> do <i>*03.32</i>	<i>RHCE*03N.01</i> do <i>RHCE*03N.07</i>	Slabi D	<i>RHD*01W.1</i> do <i>RHD*01W.161</i>
CE	<i>RHCE*04</i> <i>RHCE*04.01</i> i <i>*04.02</i>		DEL	<i>RHD*01EL.01</i> do <i>RHD*01EL.50</i>
			D-negativni	<i>RHD*01N.01</i> do <i>RHD*01N.85</i> <i>RHD*03N.01, *03N.02</i> <i>RHD*08N.01</i>

**Slika 10.** Nomenklatura alela sustava Rh, prema najnovijim popisima alela ISBT-a iz 2021. godine [11,13]. Za svaki gen svjetlocrveno su označene podskupine s fenotipom alela za funkcionalni antigen, aleli s ekspresijom označeni su sivoplavo, a ljubičasto nul-aleli bez ekspresije funkcionalnog antigena.

U popisu alela *RHD* u posebnu je grupu, pod nazivom D-pozitivni, izdvojen alel za standardni antigen D, *RHD\*01*, s dodatnim alelom *RHD\*01.01*.

U prvoj grupi, parcijalni D (ali ne *RHD*), nalaze se aleli *RHD* s ekspresijom parcijalnih antigena D prema starom nazivlju. Danas aleli te grupe imaju naziv oblika *RHD\*XX.YY*, gdje *XX* može biti dvoznamenkasta brojka koja odgovara ili arhaičnoj kategoriji, ili je na neki drugi način povezana s alelom, ili je sljedeća po redu definicije. Ako postoje podtipovi, oni se označavaju iza točke (*YY*) dvoznamenkastim rednim brojem (poput alela *RHD\*06: RHD\*06.01, RHD\*06.02*). Alternativna nomenklatura dopušta da se uvriježeni nazivi parcijalnih antigena D pišu i u imenu alela, na primjer, antigen DNB kodiran je alelom *RHD\*DNB* (prema službenoj nomenklaturi *RHD\*25*).

Druga grupa, slabi D, s alelima *RHD* koji kodiraju slabe antigene D, prema starom nazivlju. Naziv alela prema alternativnoj nomenklaturi jest *RHD\*weak D type* + brojka po redosljedu definicije. Posljednji zasad definirani alel ove grupe jest alel za slabi D tipa 161 (engl. *weak D type 161*). Određen broj alela s povijesno dodijeljenim nazivom slabi D uvršten je u prvu grupu (parcijalnih D), neki se i zovu objedinjeno. Najčešći je takav alel *RHD* u srednjoj Europi slabi parcijalni 11 (*RHD\*weak partial 11*, koji sada nema riječ *type* u nazivu). Ti aleli izvorno su proglašeni alelima slabih antigena D, no naknadno je utvrđeno da, uz slabiju reaktivnost u serološkim testovima, osobe s tim antigenom mogu stvoriti i protutijelo anti-D pri izloženosti standardnom antigenu D. Službena je nomenklatura ove grupe alela *RHD\*01W.X*, pri čemu je *X* brojka po redosljedu definicije, a *W* oznaka za *weak* (engl. 'slab'). Ako postoje podtipovi, pišu se iza brojke, odvojeni točkom i rednim brojem podtipa (poput *RHD\*01W.1.1*).

Treća grupa jest DEL, definiran kao slaba ekspresija antigena D primarno dokaziva samo adsorpcijom i elucijom (naziv DEL prema *D elution*). Radi se o iznimno slaboj ekspresiji antigena D, koja se ne može odrediti rutinskim serološkim metodama, već samo osjetljivim testom adsorpcije i elucije. Službena nomenklatura DEL alela ima oblik *RHD\*01EL.X*, pri čemu je *X* brojka po redosljedu definicije, a *EL* je oznaka za *elution*, što upućuje na metodu dokazivanja ekspresije tog alela elucijom. Alternativna nomenklatura ima oblik *RHD\*DELX*, pri čemu je *X* ista brojka kao u službenoj nomenklaturi. Primjer alela iz ove skupine jest alel *RHD\*01EL.44* ili *RHD\*DEL44*.

Četvrtu grupu, D-negativni, čine nul-aleli, aleli bez ekspresije antigena D. Službena nomenklatura glasi *RHD\*01N.XX*, gdje je XX dvoznamenkasti broj po redosljedju definicije (*RHD\*01N.04*). Ovo je jedina grupa alela *RHD* za koju alternativna nomenklatura ne postoji (osim, zbog povijesnih razloga, za alel *RHD\*08N.01*, koji je dopušteno zvati i *RHD\*Ψ* ili *RHD\*Pseudo-gene*). Uz njega, još su samo aleli *RHD\*03N.01* i *RHD\*03N.02* (zbog sličnosti u genskoj strukturi s alelima skupine *RHD\*03*) jedina tri alela ove grupe koji ne slijede opće pravilo nomenklature. U ovoj grupi posebno se izdvaja oznaka *RHD\*01N.01* za deleciju cijelog gena *RHD*. Njome nije označen *de facto* neki alel *RHD*, ali se u stručnoj javnosti s tom oznakom postupa kao da se radi o alelu, što je bio i razlog njezina uvođenja. Primjer je oznaka u genotipovima, pri određivanju zigotnosti lokusa *RHD*, pa se genotip hemizigota za lokus *RHD* može označiti s *RHD\*01 / RHD\*01N.01*. Pritom se podrazumijeva da se ne radi o dva alela, već samo o jednom genskom lokusu *RHD* (s alelom *RHD\*01*), a na homolognom kromosomu došlo je do delecije gena *RHD*.

### 1.2.3. Parcijalne D-varijante i epitopi antigena D

Podjela D-varijanti započela je šezdesetih godina 20. stoljeća kad su Tippet i Sanger podijelili parcijalne antigene D u šest kategorija ovisno o uzorcima reaktivnosti između eritrocita i protutijela RhD pozitivnih osoba koje su stvorile protutijelo anti-D [69]. Dvadesetak godina kasnije serološko testiranje antigena D revolucionarizirano je uvođenjem različitih monoklonskih protutijela anti-D. Reakcije s njima imale su drukčije uzorke reaktivnosti nego dotad uz poliklonska protutijela, a smatralo se da označavaju različite epitope antigena D (epD) [10,69].

Razvojem monoklonskih protutijela anti-D bilo je moguće definirati 30 epitopa, s nomenklaturom koja uključuje ranije uvriježene nazive. Danas su to epitopi od epD1.1 do epD16.1 uz poddiobu pojedinih epitopa (kao epD6.4). Utvrđena je reakcija pojedinog parcijalnog antigena D s monoklonskim protutijelima anti-D za svaki epD. Tako definirani epD nisu stvarni epitopi antigena D, već samo označavaju uzorke reakcija. Reakcije mogu ovisiti o koncentracijama protutijela, posebno pri epD s niskim afinitetom, pa različite serije istog protutijela mogu dati različite rezultate. Temperatura reakcije i pH mogu također promijeniti specifičnost [70].

Ekspresija epitopa antigena D proučava se dugo, no još uvijek nije do kraja razjašnjena. Jedan od ranijih modela, dobiven protočnom citometrijom, predviđa šest skupina epitopa, od kojih se neki preklapaju, a nalaze se uglavnom u 3., 4. i 6. izvanstaničnoj petlji proteina RhD. Neka protutijela anti-D prepoznaju strukturu od samo jedne, a druga strukturu od dvije, tri ili četiri izvanstanične petlje. Novije modeliranje donosi i koncept izvanstanične udubine u području 3. i 4. petlje koja bi mogla dopustiti pristup protutijelima unutarnjim područjima proteina (Slika 4) [10,34,71].

Chang i Siegel proučavali su jedinstvena protutijela anti-D iz nasumičnih klonova limfocita B u osoba koje stvaraju protutijela [72]. Otkrili su slične sekvence tih protutijela, što upućuje na to da regije proteina RhD na koje se vežu moraju biti blizu i strukturno povezane. Predložili su objašnjenje da protutijela koja se vežu na različite epitope antigena D prepoznaju jednaku strukturu. Ta struktura predstavlja većinu ili cijeli izvanstanični dio proteina, a ne prostorno različite epitope. Razlike u specifičnosti vezanja protutijela na pojedine parcijalne antigene D bile bi posljedica konformacijskih promjena unutar strukture koju prepoznaju. Sva daljnja nastojanja za analizu prirode epitopa antigena D trebaju uzimati u obzir i strukturu heterotrimerera RhD-RhAG [73].

#### **1.2.4. D-varijante slabog fenotipa**

Slabe D-varijante povijesno su se smatrale onima s potpunim antigenom D, sa svim epitopima, ali slabe ekspresije kvantitativno u serološkim testovima. U praksi je to teško odrediti jer je moguće da monoklonsko protutijelo anti-D ne reagira s eritrocitima zbog niske avidnosti protutijela, a ne zbog nepostojanja epitopa za vezanje [10].

Glavni molekularni mehanizam nastanka alela *RHD* koji kodiraju slabi fenotip D jedna je ili više supstitucija (pogrešna mutacija), SNV, uz vrlo malen broj duplikacija i insercija bez promjena okvira čitanja [11]. Za sve supstitucije aminokiselina smatra se da se nalaze u membranskim i/ili citoplazmatskim domenama proteina RhD. No, za neke slabe antigene D točnost te teorije ovisi o tome je li udubina u proteinu RhD pretpostavljena modelima isključivo izvanstanična ili još prolazi i kroz membranu [10,11].

Slabi antigeni D tipova 1, 2 i 3 najčešći su u populacijama europskog porijekla i zajedno imaju udio do 90 % svih slabih antigena D u određenoj populaciji [67]. Učestalost svakog tipa slabog antigena D različita je između pojedinih populacija. U Hrvatskoj su najučestaliji slabi D tipa 1 i tipa 3, ali je neuobičajeno razmjerno velika učestalost slabog

D tipa 14 u odnosu na druge populacije [74]. Inače iznimno rijedak, slabi D tipa 38, najčešći je slabi antigen D u Portugalu [75]. Neki antigeni fenotipa slabog D pokazuju iznimno slabu reaktivnost u rutinskom serološkom testiranju (slabi D tipa 2 i tipa 38), a neki se serološkim metodama jedva mogu odrediti [10].

Slabi antigeni D danas se sve više definiraju na molekularnoj razini preko alela koji ih kodiraju. Sve se više antigena ne uklapa u prvotnu definiciju s ekspresijom svih epitopa, a da posljedično ne mogu biti povezani sa stvaranjem protutijela anti-D. U serumu osoba s antigenom slabi D tipa 15 sa sigurnošću je utvrđeno aloprotutijelo anti-D, što je opisano i za neke druge slabe antigene D, na primjer tipova 21, 33 i 41 [11,76].

### 1.2.5. DEL fenotip

DEL fenotip označava vrlo slabo reaktivne D-varijante koje se mogu odrediti samo testom adsorpcije i elucije. Najveću učestalost ima u populacijama istočne Azije, gdje između 10 do 30 % serološki RhD negativnih osoba sadrži DEL varijantu [77-79]. Daleko najčešći alel odgovoran za DEL fenotip u tim populacijama jest *RHD\*01EL.01* (*RHD\*DELI*), posljedica sinonimne (engl. *samesense*) mutacije posljednjeg 3' nukleotida u egzonu 9 gena *RHD*, c.1227G>A. Iako sinonimna na razini aminokiselinskog ostatka, ona onemogućuje standardno prekranje (engl. *splicing*) na razini mRNA te transkripti nemaju uobičajeni egzon 9 i ne nastaje uobičajeni transkript gena *RHD* [80-85].

U populacijama europskog porijekla pronađeni su rijetki DEL aleli *RHD* (oko 0,3 % ili manje u RhD negativnih osoba). Gotovo su svi u haplotipu s alelima *RHCE\*02* (*\*Ce*) ili *RHCE\*03* (*\*cE*) [46,60,86-89]. Najčešći alel za DEL fenotip u populacijama europskog porijekla je *RHD\*11* u haplotipu *DCe*. Razlikuje se od *RHD\*01* samo u SNV c.885G>T. Alel *RHD\*11* utvrđen je u Hrvatskoj [90,91], Bosni i Hercegovini [92] te Srbiji [92]. Drugi DEL alel po učestalosti u europskim populacijama, *RHD\*01EL.08*, ima SNV unutar mjesta prekranja (engl. *splice site*), c.486+1G>A u intronu 3 gena *RHD* [46,87].

DEL aleli i DEL fenotip nisu istoznačnice. DEL fenotip označava iznimno slabu reaktivnost antigena D. DEL aleli mogu kodirati antigen D takvog fenotipa te su za sve DEL alele nedvojbeno dokazani DEL fenotipovi antigena D koje oni kodiraju. Međutim, i neki drugi aleli izvan grupe DEL alela *RHD* mogu kodirati antigen D DEL fenotipa. Osim toga, DEL aleli *RHD* odgovorni su i za D-negativan fenotip. Strukture DEL alela su varijabilne (SNV u egzonima ili intronima, veliki hibridni aleli) [78,84,85,87].

### 1.2.6. Molekularna genetika RhD negativnog fenotipa

RhD negativan fenotip može nastati potpunom odsutnošću proteina RhD u membranama eritrocita i posljedično odsutnošću svih epitopa antigena D. To objašnjava i zašto nikad nije pronađen antitetički antigen „d“ koji bi nastao ekspresijom nekog drugog alela istog gena *RHD* kao i protein RhD. Za razliku od seroloških metoda određivanja antigena D, koje pokazuju jedinstven rezultat u RhD negativnih osoba, molekularni temelji RhD negativnog fenotipa mogu biti vrlo različiti. Zbog toga su populacijska istraživanja važna, kako bi se rezultat testiranja u određenoj populaciji mogao pravilno interpretirati [10].

U populacijama europskog porijekla RhD pozitivne osobe su u pravilu ili homozigoti ili hemizigoti za gen *RHD*, uz vrlo malen broj heterozigota [93]. Najčešći genski uzrok RhD negativnog fenotipa u populacijama europskog porijekla jest homozigotnost za deleciju gena *RHD*, *RHD\*01N.01* (Slika 6). Drugi su uzroci RhD negativnog fenotipa u populacijama europskog porijekla rijetki. Delecija *RHD* (Slika 7) nastala je kao posljedica crossing-overa unutar sekvenci Rh-okvira (engl. *Rh boxes*) koje omeđuju lokus *RHD* te posljedičnim nastankom strukture hibridnog okvira (engl. *hybrid box*) [44]. Rh-okviri, uzvodni okvir (engl. *upstream box*) u smjeru 5' i nizvodni okvir (engl. *downstream box*) u smjeru 3' od lokusa *RHD*, međusobno su homologni 98,6 %. Sastoje se pretežno od sljedova ponavljajuće DNA, a unutar njih postoji tzv. područje identiteta (engl. *identity region*) od po 1463 pb u svakom Rh-okviru s 99,9 % homologije. U svakom od njih pronađeno je veliko područje od 903 pb sa 100 % homolognim sekvencama. Upravo u tom području došlo je do crossing-overa kojim nastaju hibridni okvir na kromosomu 1 i delecija gena *RHD* [44].

U populacijama afričkog porijekla najčešći je uzrok RhD negativnog fenotipa homozigotnost ili hemizigotnost za potpuni, ali neaktivan alel *RHD*, *RHD\*08N.01* (*RHD\*Ψ*) [94]. *RHD\*Ψ* karakterizira duplikacija sekvence od 37 pb (posljednjih 19 nukleotida introna 3 i prvih 18 nukleotida egzona 4), koja može dovesti do pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift mutation*) i do preranog STOP kodona. *RHD\*Ψ* ima i besmisleni (engl. *nonsense*) mutaciju u egzonu 6 (p. Tyr269stop) zbog koje definitivno ne dolazi do ekspresije proteina RhD. Obično dolazi u haplotipu s alelom *RHCE\*01* (*Dce*) [60]. Osim *RHD\*Ψ*, u osoba RhD negativnog fenotipa ovih populacija pronađeni su i hibridni aleli strukture *RHD-CE-D*, koji vjerojatno kodiraju i promijenjeni antigen C [95]. DEL aleli u populacijama afričkog porijekla nisu pronađeni [96].

U populacijama istočne Azije RhD negativan fenotip izrazito je rijedak, učestalosti oko 0,4 % [78]. Od toga je njih oko 70 % homozigota za deleciju gena *RHD*. Ostali, u pravilu s antigenom C u fenotipu, većinom imaju alel *RHD* koji kodira DEL varijantu, a pronađeni su i hibridni aleli strukture *RHD-CE-D* [77,79,81,83,85].

U istraživanju Wagnera i sur. u 8442 serološki RhD negativna davatelja krvi u njemačkoj populaciji, kao predstavnika populacija europskog porijekla, 50 (0,59 %) ispitanika imalo je gen *RHD* u haplotipu s *RHCE\*02* (*\*Ce*) ili *RHCE\*03* (*\*cE*), osim jednog uzorka s alelom *RHD\*Ψ* u haplotipu s *RHCE\*01* (*\*ce*). Molekularni mehanizmi koji su doveli do takvog serološkog rezultata uključuju DEL alele, pogrešne mutacije, mutacije unutar mjesta prekrajanja i oko njega te različite hibridne alele strukture *RHD-CE-D* [46].

### 1.2.7. Filogenetičke grupe alela *RHD*

Filogenetička istraživanja prikazuju model četiriju grupa (engl. *cluster*) alela *RHD* s ekspresijom varijanti antigena D. Svaka je grupa definirana jednim ishodišnim alelom koji se razlikuje od *RHD\*01*, a grananje se dalje širi dodatnim polimorfizmima [97-99].

**Euroazijska grupa** – sadrži *RHD\*01* koji kodira standardni antigen D te brojne alele parcijalnih i slabih D-varijanti, uglavnom u haplotipu s *RHCE\*02* (*\*Ce*) ili *RHCE\*03* (*\*cE*).

Ostale grupe nazvane su afričkim grupama zbog razmjerno veće učestalosti alela iz tih grupa u populacijama afričkog porijekla u odnosu na ostale populacije. Za sve njih karakteristična je najčešća povezanost alela *RHD* u haplotip s alelom *RHCE\*01* (*\*ce*).

**Grupa DAU** – sadrži alel *RHD\*DAU0* (*RHD\*10.00*) koji ima SNV c.1136C>T (p.Thr379Met) i ostale DAU-alele s dodatnim polimorfizmima.

**Grupa slabog D tipa 4** – sadrži alele za antigene ranijih naziva slabi D tip 4 s podtipovima (danas aleli skupine *RHD\*09*, DAR-fenotipa) te *RHD\*Ψ* i druge alele koje karakterizira SNV c.667T>G (p.Phe223Val).

**Grupa DiVa** – sadrži alele koji kodiraju najčešće fenotip parcijalnog D, a koje karakterizira SNV c.455A>C (p.Asn152Thr) [97].



### 1.3. Varijante gena *RHCE*

#### 1.3.1. Aleli *RHCE* odgovorni za polimorfizam antigena C i c

Učestalost antigena C i c znatno se razlikuje među populacijama. U populaciji europskog porijekla (Engleska), antigen C ima učestalost 68 %, a antigen c 81 %, što čini učestalost alela za antigen C (*RHCE\*02* i *\*04*) ukupno 43 %, a alela za antigen c (*RHCE\*01* i *\*03*) ukupno 57 %. U populacijama afričkog porijekla učestalost antigena c znatno je veća, a antigena C znatno manja. Nasuprot tomu, u populacijama istočne Azije učestalost antigena C gotovo je 100 %, a antigen c ima nisku učestalost [10].

Polimorfizam antigena C>c obično je kodiran sa šest nukleotidnih supstitucija u genu *RHCE* koje, uz dvije sinonimne (tihe) mutacije (engl. *synonymous*, *silent mutation*) c.150T>C i c.201G>A, dovode do razlike u četiri aminokiseline (Tablica 1). Samo se za poziciju p.103 u proteinu RhCE predviđa da je izvanstanična, u 2. izvanstaničnoj petlji (strelica C/c na Slici 4) [10].

Za ekspresiju antigena C polimorfizam p.Ser103 je nužan, ali nedovoljan. Egzoni 2 gena *RHD* i alela *RHCE\*02* (*\*Ce*) te *RHCE\*04* (*\*CE*) jednakih su sekvenci pa svi kodiraju p.Ser103. Svako protutijelo specifično za p.Ser103 reagira s produktima gena *RHD* i alela *RHCE\*02* te *RHCE\*04*. Napravljeno je istraživanje u kojem su produkti alela *RHCE\*02* pokazivali jaku reakciju s tri monoklonska protutijela anti-C, ali s produktima alela *RHCE\*04* dva protutijela uopće nisu reagirala, a treće je reagiralo slabo. Čini se da p.Pro226Ala, odgovoran za polimorfizam antigena E>e, uzrokuje konformacijske promjene u proteinu RhCE koje utječu i na ekspresiju antigena C [100]. Zato je C izrazito konformacijski antigen, a protutijela anti-C heterogena. Za potpunu ekspresiju antigena C protein mora imati p.Ser103, ali i p.Cys16 i neke druge aminokiseline prema C-kraju karakteristične za protein RhCE (Tablica 1). Međutim, p.Cys16 ipak nije nužan u svakoj ekspresiji antigena C. Postoji niz slabih i parcijalnih antigena C sa p.Trp16 [101]. Nasuprot tomu, antigen c definiran je sa p.Pro103, koji kodiraju aleli *RHCE\*01* (*\*ce*) i *RHCE\*03* (*\*cE*), ali ne i gen *RHD*. Na ekspresiju antigena c ne utječe polimorfizam p.Cys16Trp, iako p.Cys16 u alelu *RHCE\*01* može utjecati na (slabiju) ekspresiju nekih epitopa antigena e [102].

Jedan od polimorfizama za antigene C i c jest SNV c.307T>C u egzonu 2 (p.Ser103Pro) (Tablica 1). Budući da aleli za antigen C (*RHCE\*02* i *RHCE\*04*) u egzonu 2 imaju

jednaku sekvencu kao i gen *RHD* (c.307T), ona ne može poslužiti za dizajn specifičnih početnica u metodi lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) za određivanje polimorfizama specifičnih za antigen C (osim, eventualno, u uzorcima RhD negativnih osoba). S druge strane, jednostavno je dizajnirati takve početnice za alele odgovorne za antigen c jer su diskriminirajuće [94]. Korelacija ekspresije antigena C i drugog polimorfizma c.48C (p.Cys16) u egzonu 1 nije velika, tako da taj SNV ne služi specifičnom razlikovanju polimorfizma C>c. Utvrđena je specifična insercija u intronu 2 od 109 pb samo u onih alela *RHCE* odgovornih za ekspresiju antigena C. Stoga današnji molekularni testovi upotrebljavaju kako SNV c.307C, tako i inserciju u intronu 2 od 109 pb za određivanje alela *RHCE* pa se polimorfizmi za antigene C i c mogu precizno odrediti i razlikovati [103].

### 1.3.2. Aleli *RHCE* odgovorni za polimorfizam antigena E i e

Antigeni E i e drugi su par antitetičkih antigena koje kodira gen *RHCE*. U populaciji europskog porijekla (Engleska), antigen E ima učestalost 29 %, a antigen e 98 %, što čini učestalost alela za antigen E (*RHCE*\*03 i \*04) ukupno 16 %, a alela za antigen e (*RHCE*\*01 i \*02) ukupno 84 % [10]. U drugim populacijama te se brojke mnogo ne razlikuju jer u svima antigen e ima značajno veću učestalost od antigena E [104,105].

Polimorfizam antigena E>e vezan je za SNV c.676C>G u egzonu 5 gena *RHCE*, koji kodira p.Pro226Ala u izvanstaničnoj udubini proteina RhCE (Tablica 1, Slika 4). Ekspresija antigena e ne ovisi samo o p.Ala226 jer tu aminokiselinu kodira i gen *RHD*, no sam protein RhD ne pokazuje ekspresiju antigena e [32]. U osoba s rijetkim haplotipom *DCE* ekspresija antigena C obično je vrlo slaba, što upućuje na to da p.Pro226 suprimira ekspresiju antigena C. Obrnuto, polimorfizam antigena C>c nema očitog učinka na ekspresiju antigena E [100]. Mnogo različitih polimorfizama u genu *RHCE* može kvantitativno promijeniti ekspresiju antigena E i e, najčešće u antigen slabog fenotipa [106].

Polimorfizam odgovoran za ekspresiju antigena E može se odrediti specifičnom početnicom za SNV c.676C. Polimorfizam za ekspresiju antigena e, c.676G, prisutan je i u genu *RHD*. Zbog toga se početnica sa specifičnim polimorfizmom c.676C sparuje u istoj reakciji s početnicom koja se veže na sekvencu specifičnu za gen *RHCE* u egzonu 5 (na primjer, c.787A jer je u genu *RHD* na toj poziciji c.787G) [107].

## 1.4. Metode u imunohematologiji

### 1.4.1. Serološke metode određivanja antigena D

Imunohematologija proučava imunosne i genske osobine krvnih grupa, antigena krvnih stanica, posebno eritrocita, te protutijela i specifičnih proteina krvi poput komplementa. Rutinske serološke metode temelje se na reakcijama antigen – protutijelo. Protutijela anti-Rh (kao skupni naziv za sva protutijela usmjerena na antigene sustava Rh) nastaju kao odgovor na imunizaciju eritrocitima, bilo transfuzijom ili trudnoćom, iako ponekad mogu biti i prirodna protutijela. Protutijela anti-Rh najbolje reagiraju na 37 °C (tzv. topla protutijela), a njihova se reaktivnost može pojačati obradom stanica različitim enzimima. U prošlosti su za proizvodnju testnih seruma upotrebljavani serumsi bolesnika s visokim titrom protutijela. Većina protutijela anti-D čovjeka u testnim serumima neće reagirati s antigen-pozitivnim eritrocitima u direktnoj aglutinaciji bez obrade enzimom, modifikacije strukture ili dodatka pojačivača u reagens [10].

Monoklonska protutijela anti-D razvijena su krajem osamdesetih godina 20. stoljeća. Glavna metoda proizvodnje temeljena je na imortaliziranim staničnim linijama (hibridomima) nastalim fuzijom stanice mijeloma i limfocita B koji stvara protutijela anti-D. U reakciji monoklonskih protutijela anti-D s eritrocitima s parcijalnim antigenima D na membrani, identificirani su različiti epitopi na proteinu RhD [70]. Danas se za serološko određivanje RhD gotovo isključivo upotrebljavaju monoklonska protutijela anti-D i njihove mješavine (engl. *blends*). Monoklonska protutijela razreda IgM u reagensima aglutiniraju velik broj D-varijanti, ali ne aglutiniraju neke antigene slabog D i DEL fenotipa [10].

Serološke metode zlatni su standard određivanja antigena krvnih grupa i protutijela usmjerenih na njih. To su prve metode uvedene u prijetransfuzijsko testiranje i omogućile su suvremeno transfuzijsko liječenje. S obzirom na njihova ograničenja i sve veću dostupnost metoda molekularne biologije u medicini, molekularna dijagnostika i u imunohematologiji postaje sve važnija u rješavanju dvojbenih rezultata testiranja davatelja krvi i pacijenata (primatelja krvnih pripravaka), kao i rutinskom određivanju alela pojedinih gena [10].

#### 1.4.2. Molekularne metode za određivanje gena specifičnih antigena eritrocita, leukocita i trombocita

Molekularna dijagnostika danas je razvijenija u tipizaciji alela HLA nego u određivanju alela eritrocitnih antigena. Brz napredak molekularnih metoda tipizacije alela HLA omogućio je napredak transplantacijske medicine. Serološka fenotipizacija antigena HLA ima nižu dijagnostičku vrijednost u usporedbi s molekularnom tipizacijom alela HLA. Zato je tipizacija alela HLA niske, visoke ili alelne rezolucije zlatni standard u određivanju podudarnosti organa ili transplantaciji matičnih stanica hematopoeze [108]. Uz eritrocite i leukocite (limfocite) testiraju se trombociti te aleli u sustavima HPA, kao i granulociti (neutrofili) te aleli u sustavima specifičnih neutrofilnih antigena, HNA (engl. *human neutrophil antigens*). Molekularna osnova brojnih antigena u sustavima HPA i HNA je određena. U pravilu se radi o bialelnoj promjeni jedne baze (SNV) u genima za odgovarajuće glikoproteine, koji se može jednostavno odrediti molekularnom dijagnostikom [109,110].

Najupotrebljavane metode za određivanje alela eritrocitnih i trombocitnih antigena su:

- PCR-SSP (engl. *polymerase chain reaction with sequence specific primers*), metoda lančane reakcije polimerazom uz početnice specifične za određeni slijed nukleotida u testiranoj DNA.
- qPCR, akronim za PCR u stvarnom vremenu (engl. *quantitative PCR*, kvantitativni PCR, kao jedno od osnovnih obilježja PCR-a u stvarnom vremenu, engl. *real-time PCR*).
- PCR-SSO (engl. *polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotides*), metoda lančane reakcije polimerazom nakon koje slijedi hibridizacija nastalog amplikona s oligonukleotidnim probama specifičnim za određeni slijed nukleotida u DNA. Metoda PCR-SSO s polistirenskim mikrosferama gotovo je univerzalno prisutna u laboratorijima za tipizaciju alela HLA te većim laboratorijima koji određuju alele eritrocitnih antigena, zato što je pogodna za veće serije testiranja.
- PCR-RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*), proučava polimorfizam duljina odsječaka DNA dobivenih cijepanjem restriksijskim enzimima. Različiti aleli cijepanjem određenim restriksijskim enzimom daju amplikone različitih duljina, koji se mogu razlikovati elektroforezom [111].

Druge metode za tipizaciju alela sustava krvnih grupa temeljene na metodi PCR-a postoje uglavnom u istraživačkim laboratorijima u sklopu većih medicinskih centara, poput MALDI-TOF masene spektrometrije (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry*) i SBT (engl. *sequence based typing*) ili sekvenciranja DNA po Sangeru. Glavna im je vrijednost u specifičnom rješavanju problema pri testiranju široko dostupnim metodama. Istražuju se mogućnosti primjene sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, engl. *next generation sequencing*) za alele sustava krvnih grupa i to standardne metode sa sekvenciranjem kratkih odsječaka DNA [112], a odnedavno i sekvenciranja duljih odsječaka DNA (engl. *long-read sequencing*) [113].

### **1.5. Klinička važnost protutijela usmjerenih na antigene sustava Rh**

Većina protutijela anti-Rh mogu uzrokovati HBFN te akutne ili odgođene hemolitičke transfuzijske reakcije [10].

Levine i Stetson 1939. godine istraživali su hemolitičku reakciju u roditelja, kao posljedicu transfuzije krvi njezina supruga. Radilo se o porodu mrtvorodenčeta i pronalasku protutijela u serumu roditelja koje je aglutiniralo eritrocite supruga kao i eritrocite oko 80 % testiranih ABO podudarnih eritrocita. Istraživanje je pokazalo da je novi antigen neovisan od dotad poznatih antigena ABO, MN i P [114].

Landsteiner i Wiener gotovo su istovremeno, 1940. godine, eritrocitima rezus (engl. *rhesus*) majmuna (*Macaca mulatta*) imunizirali zečeve i zamorce [115,116]. Nastala protutijela, nazvana anti-rezus (anti-Rh), aglutinirala su eritrocite rezus majmuna, ali i 85 % eritrocita Njujorčana europskog porijekla. Iste su godine Wiener i Peters identificirali protutijela naizgled jednakih specifičnosti u serumima pacijenata koji su imali transfuzijske reakcije nakon primanja ABO podudarne krvi [117]. Protutijelo koje su opisali Levine i Stetson činilo se istim kao i anti-rezus [118]. Tek je dvadesetak godina kasnije otkriveno da se radi o dva različita antigena odnosno protutijela. Ime Rh za antigene na koje su bila usmjerena istraživana ljudska protutijela nije više bilo praktično promijeniti jer je do tada naziv Rh već bio u širokoj primjeni u medicini. Stoga je Levine predložio da se antigen definiran životinjskim protutijelom „anti-rezus“ nazove LW u čast Landsteiner i Wienera [119]. Antigen D, kao najjači imunogen sustava Rh, i danas se najčešće kolokvijalno naziva „Rh-faktor“.

Otkriće Levine i sur. utvrdilo je da uzrok HBFN-a leži u imunosnoj nepodudarnosti između majke i djeteta [118,120,121]. U šezdesetim godinama 20. stoljeća otkriveno je da se primarna imunizacija uzrokovana RhD nepodudarnom trudnoćom može spriječiti pasivnom primjenom imunoglobulina anti-D. Profilaksa hiperimunim globulinom danas se smatra jednim od najuspješnijih preventivnih postupaka u medicini [10].

### 1.5.1. Aloprotutijela anti-D

Aloprotutijela anti-D u pravilu su razreda IgG. U ranim fazama imunosnog odgovora moguće je dokazati i protutijela razreda IgM u serumu [122]. Za varijabilne dijelove teškog lanca ( $V_H$ ), koji su u kontaktu s antigenom, u svih protutijela anti-Rh vrijedi isključiva restrikcija za gene *IGHV3* [123]. Najveći broj protutijela anti-D pripada podrazredima IgG1 i IgG3. Podrazred IgG1 gotovo je uvijek prisutan u imuniziranih osoba, a u višestrukim imunizacijama mogu se obično dokazati oba podrazreda. Protutijela anti-D mogu tek iznimno pripadati podrazredima IgG2 i IgG4. Imunoglobulini se u krvotok fetusa prenose aktivnim transportom vezanjem za Fc receptore u posteljici. Ti receptori imaju visok afinitet za protutijela podrazreda IgG1 i IgG3. Zato se u trudnoći imunizirane majke protutijela anti-D aktivno transportiraju u krvotok djeteta i uzrokuju hemolizu eritrocita [122].

Aloprotutijela anti-D u pravilu ne aktiviraju komplement. Razlog je tomu udaljenost između antigenskih mjesta, između ostalog i zbog heterotrimerera RhAG i RhD [20] koji sprečava povezivanje molekula IgG u heksamere, što je potrebno za vezanje početne molekule komplementa C1q [122]. Zbog nemogućnosti aktiviranja komplementa protutijela anti-D gotovo nikad ne uzrokuju akutne intravaskularne hemolitičke reakcije. Eritrociti se razgrađuju sporo, ekstravaskularno, često bez vidljivih laboratorijskih znakova hemolize. Zato je zanimljiv slučaj osobe sa slabim parcijalnim antigenom D, koja je stvorila komplement-vezujuća protutijela anti-D [124].

Za objašnjenje aloimunizacija nakon transfuzija i u nepodudarnoj trudnoći proučavaju se molekularni mehanizmi u interakciji peptida antigena krvnih grupa s molekulama HLA. De Souza i sur. pokazali su povezanost povećanog rizika za aloimunizaciju antigenima D, C i E iz sustava Rh te antigenom K iz sustava Kell s grupom alela HLA-DRB1\*15 [125]. Ujedno je pokazana prezastupljenost grupe alela HLA-DRB1\*01 u pacijenata s protutijelom anti-C te grupe alela HLA-DRB1\*12 u pacijenata s protutijelom anti-D.

I u Hrvatskoj je napravljeno slično istraživanje s protutijelom anti-Fy<sup>a</sup> (Raos i sur. [126]), u kojem je također za grupu alela HLA-DRB1\*15 utvrđena značajna povezanost s aloimunizacijom na antigen Fy<sup>a</sup> iz sustava krvnih grupa Duffy.

### **1.5.2. Aloprotutijela anti-C, -c, -E, -e**

Općenito su protutijela usmjerena na antigene proteina RhCE vrlo slična protutijelima anti-D. Najčešća su razreda IgG, i to podrazreda IgG1, iako su dokazani i ostali podrazredi (IgG2, IgG3, IgG4). Ta protutijela uzrokuju ekstravaskularne hemolitičke transfuzijske reakcije, posebno odgođene [122]. Nakon protutijela anti-D klinički najznačajnije protutijelo anti-Rh jest anti-c jer može uzrokovati težak oblik HBFN-a [127]. Ostala protutijela anti-Rh rijetko uzrokuju HBFN s ozbiljnom kliničkom slikom [122]. Protutijelo anti-E javlja se češće od protutijela anti-C. Za razliku od protutijela usmjerenih na druge antigene sustava Rh, protutijelo anti-E može biti i prirodno. Protutijelo anti-e rijetko je zbog visoke učestalosti antigena e u populacijama [10].

### **1.5.3. Klinički sindromi povezani s protutijelom anti-D**

Antigen D klinički je najvažniji eritrocitni antigen nakon antigena A i B iz sustava ABO. Zbog toga se eritrociti davatelja i primatelja transfuzije krvi testiraju na antigen D. Među D-negativnim osobama koje prime D-pozitivne eritrocitne pripravke, između 20 i 30 % njih imunizira se na antigen D [58,59,128]. Zato se D-negativne osobe ne transfundiraju D-pozitivnim eritrocitima, osim u hitnim situacijama. To se posebno odnosi na D-negativne djevojčice i žene generativne dobi, koje uvijek moraju primiti transfuziju D-negativnih eritrocita, osim u slučajevima vitalne transfuzije. Protutijelo anti-D može uzrokovati hemolitičke transfuzijske reakcije pa već imunizirani pacijenti smiju primiti samo D-negativne eritrocitne pripravke. D-negativni pacijenti na imunosupresivnoj terapiji rijetko se imuniziraju nakon liječenja D-pozitivnim eritrocitima [129].

Prije uvođenja profilakse hiperimunim globulinom HBFN uzrokovan protutijelima anti-D bio je značajan uzrok fetalnih i neonatalnih pobola te smrtnosti. Dvadesetak godina nakon uvođenja profilakse te brojke su se smanjile i do 50 puta. Mehanizam te supresije imunskog sustava protutijelima još nije istražen u potpunosti [130].

Sve D-negativne žene nakon poroda D-pozitivnog djeteta moraju unutar 72 sata primiti hiperimuni imunoglobulin anti-D. Dozu bi trebalo prilagoditi količini transplacentalnog

krvarenja. U većini razvijenih zemalja provodi se antenatalna profilaksa primjenom hiperimunog imunoglobulina u razdoblju od 28. do 34. gestacijskog tjedna s ciljem dodatnog smanjenja stope prijevorođajne imunizacije trudnica [131,132].

Prenatalno se ozbiljnost HBFN-a procjenjuje analizom količine protutijela anti-D, spektrofotometrijski ili semikvantitativno titrom, određivanjem podrazreda IgG i njihove funkcionalne aktivnosti. Podrazredi IgG1 i IgG3 mogu uzrokovati HBFN, a IgG2 i IgG4 ne mogu [122]. Koristan je i neinvazivni test koji služi u prenatalnoj dijagnostici HBFN-a. Radi se o određivanju fetalnog gena *RHD* analizom slobodne cirkulirajuće fetalne DNA (engl. *cell-free fetal DNA*, cffDNA) iz plazme trudnice, koja čini 3 do 6 % slobodne cirkulirajuće DNA (engl. *cell-free DNA*, cfDNA) u toj plazmi [132,133].

Globalno postoji nedostatak hiperimunog imunoglobulina anti-D jer se on proizvodi imunizacijom D-negativnih dobrovoljaca D-pozitivnim eritrocitima. Postoji i etička dilema povezana s imunizacijom zdravih osoba injektiranjem nepodudarnih eritrocita. Tehnologije monoklonskih i rekombinantnih protutijela koje mogu osigurati neograničene količine imunoglobulina proizvodnjom *in vitro* činile su se obećavajućima. Međutim, klinički pokusi razočarali su zato što su monoklonska protutijela općenito manje učinkovita u uništavanju D-pozitivnih eritrocita od poliklonskih, što je, najvjerojatnije, posljedica neprirodne glikozilacije molekula monoklonskih protutijela anti-D [134,135].

Mogući je pristup prevencije HBFN-a i peptidna imunoterapija – imunodominantni peptidi proteina RhD služe za stvaranje tolerancije pomoćničkih limfocita T specifičnih za RhD. Potvrđeno je da ti peptidi induciraju proliferaciju pomoćničkih limfocita T aloimuniziranih davatelja krvi *in vitro* [136]. U humaniziranom mišjem modelu produkt transgena HLA-DRB1\*15 pokazao je sposobnost odgovora na imunizaciju pročišćenim proteinom RhD. Tretiranje tih miševa peptidima proteina RhD kroz sluznicu nosa dovelo je do tolerancije sprečavanjem proizvodnje protutijela i aktivacije limfocita T [137].

Ponekad se javljaju neočekivano blagi slučajevi HBFN-a u RhD pozitivnih fetusa žena s protutijelima anti-D koje su u prethodnim trudnoćama imale HBFN s teškom kliničkom slikom. Jedan od razloga blagog oblika bolesti mogu biti majčina IgG aloprotutijela anti-HLA koja na fetalnim makrofazima blokiraju Fc receptore, čime štite imunizirane fetalne eritrocite od uništavanja. Protutijela koja blokiraju receptore FcγRI imaju potencijal za primjenu u liječenju HBFN-a [138,139].



#### 1.5.4. Varijante *RHD* i transfuzijsko liječenje

U vezi s određivanjem antigena D u pacijenata, preporučuje se testiranje direktnom aglutinacijom dvama različitim monoklonskim protutijelima IgM anti-D [140,141]. Odabrana protutijela trebaju davati negativnu reakciju s parcijalnim antigenima DVI (produkti alela *RHD\*06*) [10]. Nositelji antigena DVI kao pacijenti se proglašavaju D-negativnima i primaju transfuziju D-negativnih eritrocita, kako ne bi stvorili protutijela anti-D, a trudnice trebaju primiti terapiju imunoglobulinom nakon trudnoće s D-pozitivnim djetetom. Određivanje slabih antigena D u pacijenata metodom IAT se ne preporučuje [142]. Zato se pacijenti sa slabom ekspresijom antigena D, uključujući i one DEL fenotipa, ne otkrivaju te su također proglašeni D-negativnima. Ovisno o izboru testnih seruma, ako se otkriju neki parcijalni antigeni D, pacijenti mogu biti proglašeni D-pozitivnima, pa se pri transfuziji D-pozitivnih eritrocitnih pripravaka mogu izložiti riziku imunizacije. Ako se u testiranju antigena D dvama reagensima monoklonskih protutijela anti-D dobije slaba reakcija ( $\leq 2+$ ) ili različite reakcije, pacijent se smatra D-negativnim, dok se ne razriješi uzrok takvog rezultata [10]. Takve nesukladne rezultate najbolje je razriješiti molekularnim testiranjem. Utvrđeno je da osobe sa slabim antigenom D tipova 1, 2, 3, 4.0 i 4.1 stvaraju aloprotutijela anti-D iznimno rijetko, ako uopće, pa je prema najnovijim smjernicama racionalno te pacijente smatrati D-pozitivnima, kako bi se sačuvale zalihe D-negativne krvi [143]. Eventualno, zbog iznimnog opreza trudnice sa slabim D tipa 4.0 mogu se smatrati D-negativnima i mogu primiti imunoglobulin. Pacijenti s ostalim D-varijantama smatraju se D-negativnima, što zbog njihove niske učestalosti, ne utječe znatno na smanjenje zaliha rjeđe dostupne D-negativne krvi [10,143].

U vezi s davateljima krvi, eritrociti koji mogu imunizirati D-negativnog pacijenta, odnosno potaknuti stvaranje protutijela anti-D, moraju se označiti kao D-pozitivni [10]. Zbog toga se upotrebljavaju reagensi koji u direktnoj aglutinaciji moraju dati pozitivnu reakciju najmanje s antigenom DVI (produktom alela *RHD\*06*) i većinom drugih D-varijanti, kako potencijalno ne bi došlo do imunizacije D-negativnih pacijenata transfuzijom takvih krvnih pripravaka [144]. Osobe s antigenom DVI zato su označene D-pozitivne kao davatelji krvi, a D-negativne kao pacijenti. Svi RhD negativni davatelji krvi u direktnim tehnikama, radi potencijalnog otkrivanja ostalih varijanti antigena D, moraju biti testirani u indirektnom antiglobulinskom testu, što je i obaveza prema hrvatskim preporukama [10,144].

Ostaje problem dokaza onih D-varijanti, koje se ne mogu odrediti aglutinacijskim testovima, poput D-varijanti DEL fenotipa, čak ni u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT). U literaturi je dokumentirano da DEL [145,146] i druge slabe D-varijante [78,147,148] mogu uzrokovati imunizaciju D-negativnih pacijenata. Zato se u nekim transfuzijskim centrima, u čemu prednjače dijelovi Europe, uvodi probir serološki RhD negativnih davatelja na *RHD*, kako bi se izbjegla transfuzija eritrocita DEL fenotipa pacijentima koji su zaista RhD negativni. Budući da su DEL aleli *RHD* najčešće haplotipski vezani uz alele *RHCE\*02* (*\*Ce*) ili *RHCE\*03* (*\*cE*), neki transfuzijski centri u liječenju RhD negativnih pacijenata, osobito djevojčica i žena u generativnoj dobi, primjenjuju eritrocitne pripravke isključivo fenotipa *dccee* [89,149-151].

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja sustava Rh u populaciji serološki RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske bili su sljedeći:

1. opisati varijante gena sustava Rh u ispitivanoj populaciji i odrediti njihovu učestalost
2. odrediti haplotipove i genotipove *RHD-RHCE* u pojedinog ispitanika i odrediti njihovu učestalost
3. usporediti rezultate ovog istraživanja s dostupnim podacima iz Hrvatske i drugih populacija
4. objasniti proturječne rezultate seroloških i molekularnih metoda u imunohematološkoj dijagnostici sustava Rh, što će doprinijeti poboljšanju sigurnosti transfuzije krvnih pripravaka (sprečavanje imunizacije primatelja)
5. na temelju rezultata istraživanja predložiti algoritam uvođenja molekularnih metoda u rutinsko testiranje davatelja krvi.

Osnovna hipoteza ovog istraživanja bila je da će se u populaciji serološki RhD negativnih davatelja krvi molekularnim metodama utvrditi prisutnost određenih varijanti gena *RHD*. Očekivalo se da utvrđeni alel *RHD* u pojedinog ispitanika pripada skupini alela koji kodiraju DEL ili RhD negativan fenotip. Sekundarna hipoteza bila je da će vjerojatnost pronalaska varijanti gena *RHD*, kao i njihova učestalost u ispitivanoj populaciji, biti znatno manja u ispitanika homozigota za alel *RHCE\*01* od one u ispitanika koji imaju neki od ostalih alela *RHCE* (*RHCE\*02*, *\*03* i *\*04*). Pretpostavljeno je da će prisutnost varijanti gena *RHD* biti dokazana u manje od 1 % ispitivane populacije.

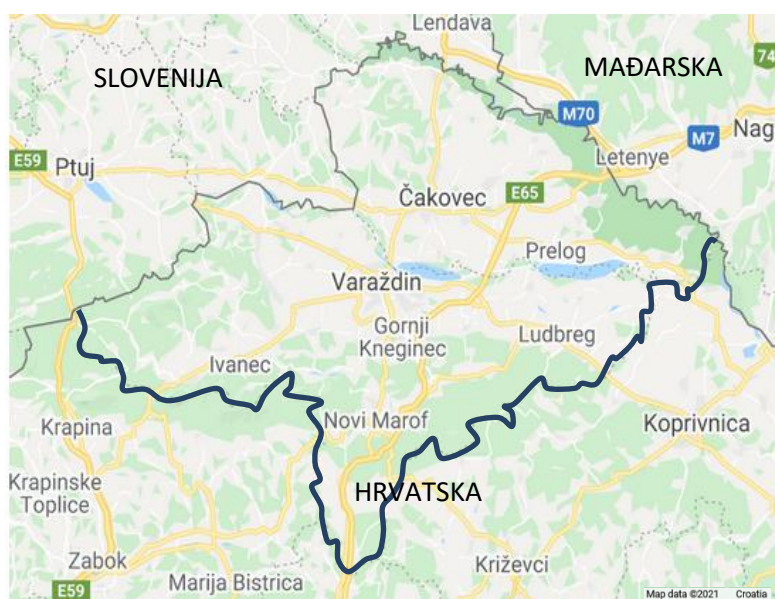
### 3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Ispitanici u ovom istraživanju bili su dobrovoljni davatelji krvi koji žive na području sjeverozapadne Hrvatske, u Međimurskoj i Varaždinskoj županiji (Slika 11). Krv su darovali u okviru akcija u organizaciji Odjela za transfuzijsku medicinu Opće bolnice Varaždin u razdoblju od gotovo dvije godine, između svibnja 2017. i ožujka 2019. godine. U ovom prospektivnom istraživanju sudjelovalo je ukupno 704 nesrodnih ispitanika, nasumično odabranih iz skupine RhD negativnih davatelja krvi u rutinskom serološkom testiranju. Testiranje na RhD je zakonska obveza za uzorke svih davatelja krvi u Hrvatskoj, uz određivanje antigena sustava ABO (Zakon o krvi i krvnim pripravcima, NN79/06, čl. 15 te Pravilnik o osiguranju kvalitete krvi i krvnih pripravaka u zdravstvenim ustanovama, NN91/19, čl. 21) pa nije bio potreban dodatni informirani pristanak ispitanika [152,153].

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Opće bolnice Varaždin, Odlukom o davanju suglasnosti, broj: 02/1-91/97-2020 od 15. travnja 2020. godine.

Ispitanicima je uzet uzorak periferne krvi s antikoagulansom K<sub>2</sub>EDTA volumena 6 ml.

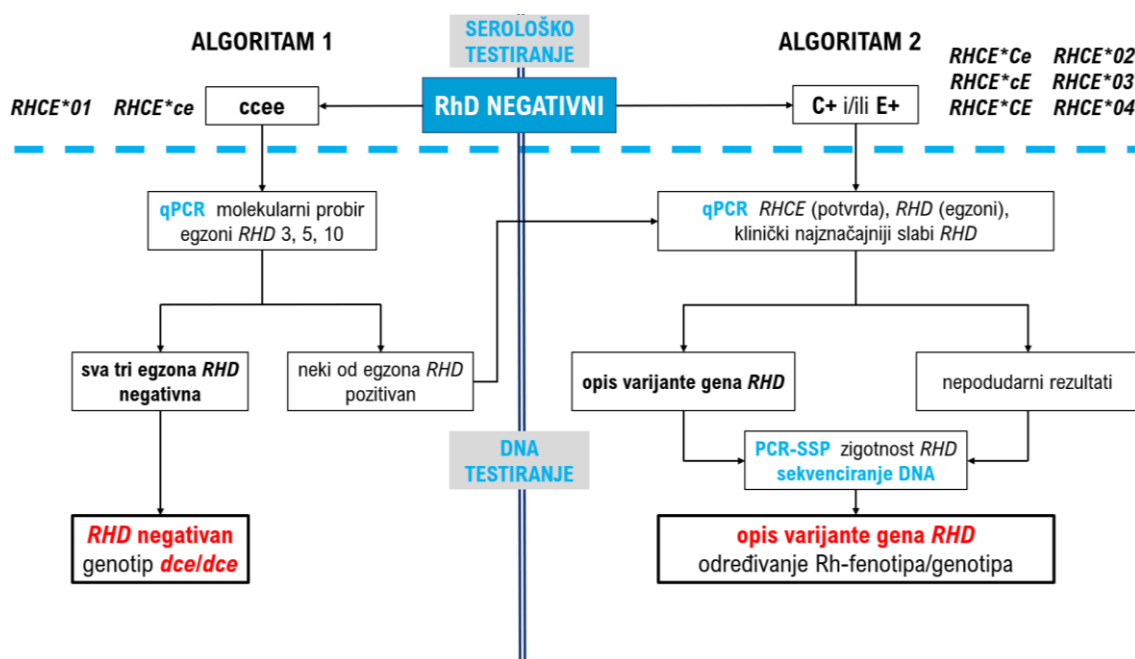


**Slika 11.** Zemljopisni položaj sjeverozapadne Hrvatske (Međimurska i Varaždinska županija). Karta preuzeta s [google.com/maps](https://www.google.com/maps), modificirana prema Uvjetima pružanja usluge Google.

### 3.2. Plan istraživanja

Početno određivanje antigena D bilo je serološko testiranje prema nacionalnim preporukama: svi uzorci testirani su metodama direktne aglutinacije, a negativni dodatno i u indirektnom antiglobulinskom testu [144]. U ovo istraživanje uključeni su samo uzorci čiji je rezultat u oba testa bio RhD negativan. Serološki je svima određen i Rh-fenotip, odnosno određivanje antigena C, c, E i e. Rezultat u tom testu bio je kriterij odabira algoritma za molekularno testiranje u nastavku istraživanja.

Plan istraživanja prikazan je na Slici 12.



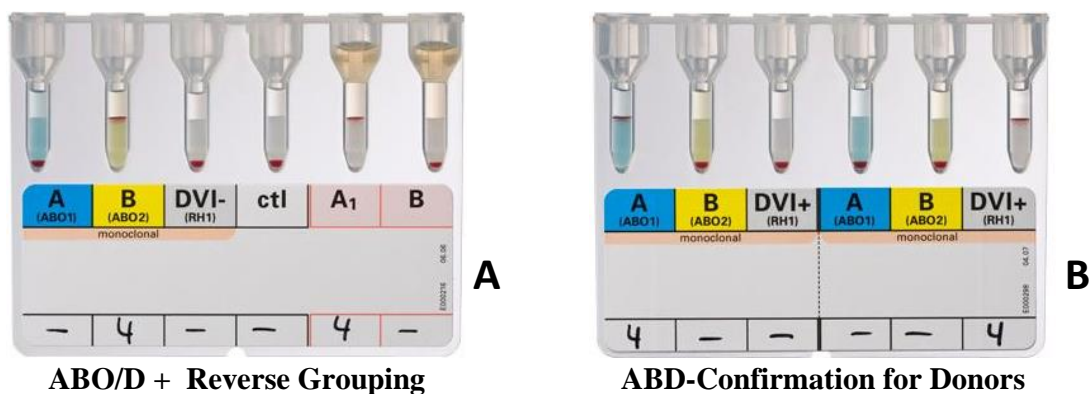
**Slika 12.** Plan istraživanja alela sustava Rh u populaciji serološki RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske.

### 3.3. Serološko testiranje uzoraka

Serološko određivanje Rh-fenotipa napravljeno je u Laboratoriju za imunohematološko testiranje davatelja krvi Odjela za transfuzijsku medicinu Opće bolnice Varaždin u skladu s nacionalnim preporukama [144]. Uzorak za testiranje uzet je u tijeku postupka davanja krvi u epruvetu s antikoagulansom EDTA, a samo testiranje provedeno je unutar 24 sata od uzimanja krvi.

#### 3.3.1. Direktno određivanje antigena D tehnikom u mikrokartici

Antigen D određivao se direktnom aglutinacijom tehnologijom gel-mikrokartice (*Bio-Rad Laboratories, SAD*). Svim davateljima pri prvom davanju krvi određena je krvna grupa u duplikatu iz dva neovisna uzorka s dvije vrste mikrokartica: ID-Card DiaClon ABO/D + Reverse Grouping (*Bio-Rad Laboratories*) [154] i ID-Card DiaClon ABD-Confirmation for Donors (*Bio-Rad Laboratories*) [155]. Kartice unutar gel-matriksa sadrže monoklonska protutijela. U prvoj mikrokartici nalazi se testni reagens monoklonsko protutijelo anti-D koje ne reagira s parcijalnim antigenom D kategorije VI (stanične linije LHM59/20 (LDM3) i 175-2). U drugoj je kartici test reagens monoklonsko protutijelo anti-D različito od prvog, koje otkriva parcijalni antigen D kategorije VI (stanične linije ESD-1M i 175-2). Ako je na eritrocitima prisutan antigen D, ovisno o količini antigena, eritrociti ostaju na vrhu gel-matriksa (rezultat 4+) ili se rasporede unutar njega (rezultat 1+ do 3+). Ako na eritrocitima nema antigena D, eritrociti nakon centrifugiranja sedimentiraju na dno mikrostupca (rezultat 0). Primjer rezultata određivanja antigena D davatelja krvi u mikrokarticama je na Slici 13.



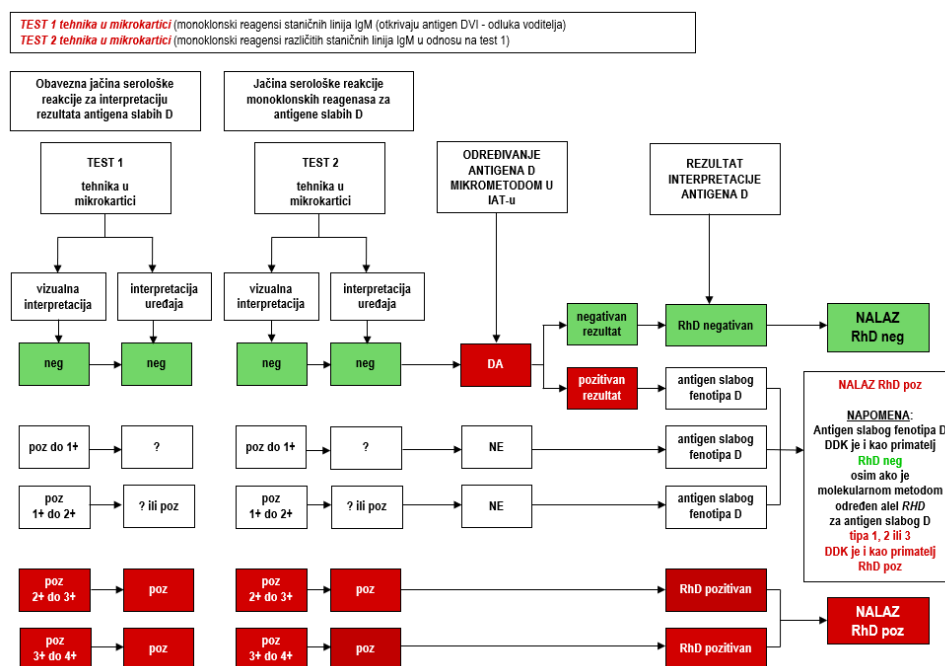
**ABO/D + Reverse Grouping**      **ABD-Confirmation for Donors**  
**Slika 13.** Primjer rezultata serološkog testiranja davatelja krvi: (A) Test koji ne otkriva antigen DVI (uzorak RhD negativan), izvor [156], (B) Test koji otkriva antigen DVI (lijevi uzorak RhD negativan, desni uzorak RhD pozitivan), izvor [157].

Krvna grupa ispitanika određena je poluautomatskom metodom uz odgovarajuću opremu i mikrokartice prema uputi proizvođača (sve *Bio-Rad Laboratories*). Za pripremu 5 %-tne suspenzije ispitivanih stanica i pipetiranje upotrijebljen je pipetor ID Sampler II F. Suspenzija eritrocita napravljena je uz 0,5 ml ID Diluent 2, modificiranu otopinu niske ionske jakosti (LISS, engl. *low ionic salt solution*), te 50  $\mu$ l pune krvi ili 25  $\mu$ l sedimenta eritrocita. Kartice su zatim centrifugirane pri sobnoj temperaturi (18 do 25 °C) po 10 minuta u centrifugi ID-Centrifuge 24 S pri 910 rpm (85 rcf). Rezultati su očitani u čitaču kartica Saxo ID-Reader. Nakon validacije pozitivni rezultati obaju testova ispitnika automatski su preneseni u informatičku bazu podataka. Negativni rezultati bili su dodatno ispitani u IAT-u. Tablica 4 sadrži način interpretacije rezultata ovih testova [154,155]. Algoritam interpretacije rezultata antigena D u mikrokartici davatelja krvi po nacionalnim preporukama je na Slici 14 [144].

**Tablica 4.** Interpretacija rezultata određivanja RhD u mikrokarticama pri određivanju krvne grupe.

Rezultat RhD		Interpretacija
Anti-DVI +	anti-DVI –	
3+ do 4+	3+ do 4+	RhD pozitivan
± do 2+	± do 2+	Slabi antigen D
Negativan	Negativan	RhD negativan *
1+ do 3+	Negativan	D-varijanta – vjerojatno DVI
Negativan	1+ do 3+	D-varijanta – osim DVI

\* Slabi antigeni D mogu dati slabu ili negativnu reakciju, pa u davatelja krvi sve negativne rezultate treba testirati u IAT-u.



**Slika 14.** Algoritam testiranja antigena D. Uzorci u ovom istraživanju slijede zeleno obojeni tijekom testiranja. Preuzeto i prilagođeno prema [144].

### 3.3.2. Određivanje antigena D u indirektnom antiglobulinskom testu

Ispitanicima koji su u oba direktna testa s reagensima anti-D bili negativni, prisutnost antigena D na eritrocitima ispitao se u IAT-u, kojim se mogu dokazati slabi fenotipovi antigena D. Za IAT je upotrebljavan anti-D reagens NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG Monoclonal Blend (*Immucor, SAD*). Davatelji krvi kojima je u IAT-u dokazan antigen D jesu RhD pozitivni. Davatelji krvi kojima u IAT-u nije dokazan antigen D jesu RhD negativni i njihovi uzorci time su zadovoljili glavni uvjet za uključivanje u populaciju ispitanika u ovom istraživanju.

### 3.3.3. Određivanje antigena C, c, E i e

Antigeni C, c, E i e bili su određeni metodom aglutinacije u mikrotitarskoj ploči testom DiaMed-MP Test C, c, E, e, K, uz dodatne reagense i uređaje (sve *Bio-Rad Laboratories*) [158]. Test se radio u barkodiranim mikropločama od 96 jažica. Svaka ploča dovoljna je za 16 testiranja (za svaki test potrebno je šest jažica). U jažicama se nalaze protutijela: anti-C (stanična linija MS-24), anti-c (stanična linija MS-33), anti-E (stanična linija MS-260), anti-e (stanična linija MS-63), anti-K (stanična linija MS-56) kao i negativna kontrola (pufer bez protutijela). Od dodatnih reagenasa potreban je ID-Diluent 1, modificirana enzimatska otopina (bromelain) za suspenzije eritrocita. Za pripremu uzorka napravljena je 0,8 %-tna suspenzija eritrocita u ID-Diluentu 1 pipetiranjem 1,0 ml ID-Diluenta 1 u čistu staklenu epruvetu te dodavanjem 20 µl pune krvi ili 10 µl sedimenta eritrocita. U odgovarajuće jažice na mikroploči pipetirano je po 50 µl suspenzije eritrocita. Mikroploča je bila inkubirana 10 do 15 minuta pri sobnoj temperaturi (18 do 25 °C) te centrifugirana 90 sekundi pri 900 rpm (85 rcf) u centrifugi DiaCent-MP 2 Centrifuge, također pri sobnoj temperaturi (18 do 25 °C).

Interpretacija rezultata počiva na principu da slaba ili jaka pozitivna reakcija pokazuje prisutnost odgovarajućeg antigena. Jako pozitivna reakcija očituje se u potpunoj aglutinaciji ili 2 – 3 aglutinata skupljena na dnu jažice. Slabo pozitivnu reakciju karakterizira prisutnost malih aglutinata na dnu jažice i često brojnih slobodnih stanica u suspenziji. Negativnu reakciju definira odsutnost vidljive aglutinacije, što ukazuje da nije došlo do reakcije između antigena i reagensa (protutijela).



### 3.4. Molekularno testiranje uzoraka

Molekularno testiranje uzoraka ispitanika napravljeno je u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. S obzirom na dostupne podatke iz literature o različitoj vjerojatnosti utvrđivanja neke varijante gena *RHD*, ovisno o prisutnim alelima *RHCE* u pojedine osobe [87,96], testiranje uzoraka populacije koja je zadovoljila početni kriterij (negativan rezultat u serološkom određivanju RhD), nastavilo se slijedeći dva algoritma, ovisno o Rh-fenotipu.

#### Algoritam 1

Molekularnim (DNA) probirom (engl. *screening*), testom za detekciju egzona 3 ili 5 te 10 gena *RHD* metodom qPCR započelo je testiranje onih uzoraka kojima je serološki utvrđena prisutnost isključivo antigena c i e na proteinu RhCE (produktu alela *RHCE\*01* odnosno *RHCE\*ce*), dakle isključivo homozigota *RHCE\*01,\*01*.

Za uzorke s jasno negativnim rezultatom svih triju ispitivanih egzona *RHD* utvrđen je konačan rezultat *RHD* negativan. Za uzorke s pozitivnim rezultatom ili ponovljeno potvrđenom sumnjom na pozitivan rezultat bilo kojeg od egzona 3 ili 5 te 10 gena *RHD* u probirnom testiranju, testiranje se nastavlja po algoritmu 2.

#### Algoritam 2

Svi uzorci u kojima je serološki utvrđena prisutnost antigena C i/ili E na proteinu RhCE, kao i eventualni pozitivni rezultati probira za gen *RHD* u homozigota *RHCE\*01,\*01* (po algoritmu 1), testirani su različitim spektrom testova i metoda (qPCR, PCR-SSP, sekvenciranje DNAPo Sangeru, test adsorpcije i elucije).

Ispitanici sa serološki određenim antigenom C i/ili E mogu biti ili homozigoti za alele *RHCE\*02,\*03* i *\*04*; ili neka kombinacija tih alela u heterozigota (kao *RHCE\*02,\*03*); ili heterozigotna kombinacija nekog od tih alela s alelom *RHCE\*01* (kao *RHCE\*01,\*02*). Svi uzorci ispitanika takve genske strukture nisu bili testirani probirnim testom za detekciju triju egzona *RHD* kojim je napravljen probir homozigota *RHCE\*01,\*01* (algoritam 1). Testiranje po algoritmu 2 napravljeno je najprije metodom qPCR, testom koji određuje polimorfizme karakteristične za svaki egzon gena *RHD* (osim egzona 8), polimorfizme odgovorne za ekspresiju klinički najznačajnijih parcijalnih i slabih antigena D te polimorfizme u genu *RHCE* koji kodiraju antigene C, c, E i e.

U svim uzorcima u kojima je utvrđen polimorfizam karakterističan za neki od egzona *RHD* dodatno je molekularnim testiranjem određena zigotnost lokusa *RHD* metodom

PCR-SSP te slijed nukleotida svakog egzona *RHD* metodom sekvenciranja DNA po Sangeru (dideoksi-metodom). Naknadno se svim takvim uzorcima provjerila i prisutnost proteina RhD ili njegovih epitopa na eritrocitima ispitanika serološkom metodom adsorpcije i elucije.

### **3.4.1. Izolacija DNA**

Početni materijal za analizu gena *RHD* i *RHCE* bila je ljudska genomska DNA izolirana iz uzorka pune krvi svakog ispitanika. DNA je izolirana dvjema jednakovrijednim metodama, automatiziranom i ručnom. Validirane su dobivanjem jednakog rezultata u testu za proširenu tipizaciju alela sustava Rh metodom qPCR iz istog uzorka krvi *RHD* pozitivne osobe. Koncentracija pojedinih uzoraka DNA u ovom istraživanju nije određivana. Izračuni za pipetiranje reagenasa napravljeni su s radnom pretpostavkom da je koncentracija DNA oko 30 ng/ $\mu$ l, na temelju ranijih validacija ovih metoda. Volumen izolirane DNA bio je 200  $\mu$ l.

#### **3.4.1.1. Automatizirana izolacija DNA**

Automatizirana metoda s magnetnim mikrosferama napravljena je u aparatu MagNA Pure LC 2.0 uz komercijalni set MagNA Pure LC DNA Isolation Kit, za izolaciju genomske DNA iz pune krvi, krvnih stanica ili kulture stanica, prema uputama proizvođača (*Roche Diagnostics*, Njemačka) [159]. Automatizirani su postupci sljedeći: prvo se liziraju stanice krvi, što oslobađa DNA iz limfocita. Zatim se puferom s kaotropnim solima, koje razaraju hidrofobne interakcije, denaturiraju oslobođene nukleaze. Nakon dodavanja proteinaze K slijedi digestija oslobođenih staničnih proteina. Zatim se dodaju čestice magnetnog stakla (engl. *magnetic glass particles, MGPs*) na čiju se silikatnu površinu veže negativno nabijena DNA, koje se magnetom odvoje od ostatka liziranog uzorka. Slijedi nekoliko koraka ispiranja radi smanjenja koncentracije kaotropnih soli i odvajanja ostataka staničnih membrana i eventualnih inhibitora PCR reakcije. Pročišćena DNA eluira se s čestica magnetnog stakla elucijskim puferom.

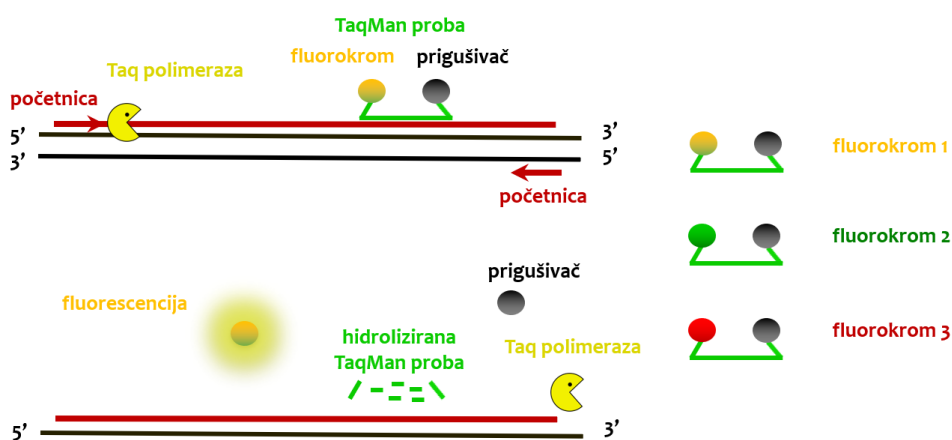
#### **3.4.1.2. Izolacija DNA na kolonama s centrifugiranjem**

Ručna metoda na kolonama s centrifugiranjem napravljena je komercijalnim setom Ready DNA Isolation Spin Kit, prema uputama proizvođača (*Inno-train Diagnostik*, Njemačka) [160]. Ta se metoda koristi svojstvom adsorpcije DNA u prisutnosti visokih koncentracija kaotropnih soli na površinu silicijevog(IV) oksida ( $\text{SiO}_2$ ). Stanice

(limfociti) liziraju se otopinom za liziranje koja sadrži kaotropnu sol, proteazu te RNazu A. Zatim se lizat s DNA oslobođenom iz stanica adsorbira na kolonu s filterom SiO<sub>2</sub> koji zadržava DNA, a propušta ostali sadržaj. DNA se eluira u destiliranoj vodi bez nukleaza ili puferu s malom koncentracijom soli, na primjer 10mM TE pufer.

### 3.4.2. PCR u stvarnom vremenu – tehnologija FluoGene

Tehnologija FluoGene (*Inno-train Diagnostik*) nadogradnja je izvorne metode PCR-SSP u PCR u stvarnom vremenu (qPCR) [161]. Koristi se posebno promijenjenim TaqMan probama, hidrolitičkim probama kojima se povećava specifičnost PCR reakcije (Slika 15). TaqMan probe su oligonukleotidne probe komplementarne određenom specifičnom slijedu nukleotida u DNA [162]. Svaku probu moguće je konjugirati različitim fluorokromom, pa u jednoj reakcijskoj smjesi može biti više hidrolitičkih proba obilježenih različitim fluorokromima. Time se omogućuje određivanje puno većeg broja polimorfizama u određenom broju jažica, nego klasičnom metodom PCR [163].



**Slika 15.** Princip tehnologije FluoGene (qPCR). Crne linije označavaju lance kalupa DNA za amplifikaciju. Crvena linija prikazuje novosintetiziranu DNA. Zelena je linija TaqMan proba izvorno vezana na jedan lanac kalupa DNA. Izvor [163].

Svaka intaktna oligonukleotidna proba na svojem 5'-kraju ima konjugirani fluorokrom. Na 3'-kraju je prigušivač (engl. *quencher*) koji apsorpcijom prigušuje emisiju fluorescencije fluorokroma kad su obje molekule sterički blizu, na primjer kad su obje vezane na oligonukleotid. Prigušivanje fluorescencije posljedica je Försterova prijenosa rezonantne energije (engl. *Förster resonance energy transfer*, FRET) [164]. Na nižoj se temperaturi na kalup DNA vežu i početnice i hidrolitičke probe. Povećanjem temperature

potiče se 5'→3' DNA-ovisna DNA-polimerazna aktivnost Taq polimeraze koja omogućuje replikaciju DNA i stvaranje amplikona. Dolaskom do hibridizirane komplementarne oligonukleotidne probe Taq polimeraza pokazuje 5'→3' egzonukleaznu aktivnost te hidrolizira po jedan nukleotid probe. Nukleotide oslobađa u otopinu i nastavlja s polimeraznom aktivnošću. U tom se procesu fluorokrom i prigušivač oslobode u otopinu te više nisu sterički blizu. Fluorokrom tada slobodno emitira fluorescenciju čiji se intenzitet mjeri detektorom i proporcionalan je broju molekula novosintetizirane DNA. Ako se oligonukleotidna proba zbog nekomplementarnih sekvenci ne može vezati na kalup DNA pa ne dolazi do PCR reakcije, odnosno nema sinteze DNA, fluorokrom se ne može otpustiti u otopinu i ne može slobodno emitirati fluorescenciju. U metodi qPCR intenzitet fluorescencije mjeri se na kraju svakog PCR ciklusa, što omogućuje grafički prikaz u programu te praćenje u stvarnom vremenu odvijanja PCR reakcije.

Testovi FluoGene validirani su za rad u qPCR uređaju FluoQube (*Inno-train Diagnostik*). Za evaluaciju rezultata upotrebljavaju se dva računalna programa. Prvi je qPCRsoft (*Analytik Jena*, Njemačka), pogonski program FluoQube aparata, a drugi je FluoGene Software (*Inno-train Diagnostik*), kratice FGSW, program za analizu rezultata testova FluoGene. U ovom istraživanju upotrebljavao se program qPCRsoft verzije 3.4, a za evaluaciju rezultata testiranja program FGSW verzije 1.6.2.3.

Nakon završetka testiranja metodom qPCR podaci se iz programa qPCRsoft integriranim programom prevode i učitavaju u FGSW. Baze alela sustava krvnih grupa povremeno se ažuriraju, pri otkrivanju pojedinih alela ili kad se pokaže potreba za njihovom detekcijom u većem broju populacija. Pri svakoj promjeni baza alela, a prije početka analize rezultata u FGSW-u, potrebno je učitati datoteke s najnovijim bazama alela.

Princip interpretacije rezultata u FGSW-u podjednak je za sve testove RBC-FluoGene (RBC, engl. *red blood cell*, eritrocit). Svaka serija testova ima svoju datoteku s algoritmom interpretacije (prilozi 1 i 2) te se učitava u FGSW prije početka analize novom serijom testova. Uz zadovoljene kriterije kontrole kvalitete i bez sumnjivih reakcija program automatski utvrđuje rezultat testiranja svakog ispitivanog lokusa. Polimorfizmi u ispitivanom uzorku DNA prikazani su ispod rezultata. Određeni alel dokazuje se pozitivnom reakcijom u jednoj ili više jažica na PCR pločici, ovisno o tome koja je kombinacija početnica i oligonukleotidnih proba prisutna u pojedinoj jažici prema algoritmu interpretacije. Reakcija u jažici je pozitivna ako je tzv. Q-vrijednost (engl.

*Q-value*) veća od granične vrijednosti (engl. *cut-off*) koju definira proizvođač za svaki par početnica i proba u svakoj seriji testova. Točan način izračuna *Q*-vrijednosti poslovna je tajna proizvođača, a ovisi o *Ct*-vrijednosti pojedine reakcije i nagibu reakcijske krivulje te reakcije. U FGSW-u postoji grafički prikaz reaktivnosti svih parova početnica i proba u odnosu na odgovarajuću graničnu vrijednost. Prikazana je i reaktivnost interne kontrole, koja mora biti pozitivna u svim reakcijama u kojima specifični par početnice i probe (čiji broj ovisi o testu koji se radi) ima negativnu reakciju (*Q*-vrijednost ispod granične vrijednosti). Taj je uvjet kontrola kvalitete PCR reakcija u svakoj jažici za pouzdanost dobivenog rezultata, uz uvjet da je negativna kontrolna jažica prisutna na svakoj PCR pločici zaista negativna (*Q*-vrijednost ispod granične vrijednosti) kao kontrola kontaminacije PCR pločice. U probirnim testovima jedna specifična jažica za uzorak služi kao negativna kontrolna jažica.

### 3.4.3. Testovi RBC-FluoGene

U pakiranjima svih testova RBC-FluoGene nalaze se PCR pločice s prealiktiviranim i osušenim mješavinama početnica i oligonukleotidnih proba označenih fluorokromima [163]. U svakoj jažici PCR pločice je reakcijska smjesa za odvijanje multipleks PCR reakcije (jedan ili nekoliko parova početnica te dvije ili tri oligonukleotidne probe s fluorokromima):

- a) fluorokrom 1 – proba specifična za određeni polimorfizam karakterističan za pojedini alel ili varijantu
- b) fluorokrom 2 – proba specifična za gen ljudskog hormona rasta, *HGH* (engl. *human growth hormone*), koji je interna kontrola PCR reakcija
- c) fluorokrom 3 – samo u pojedinim reakcijama, vezan za dodatnu probu specifičnu za dodatni polimorfizam karakterističan za pojedini alel ili varijantu

Ostali reagensi potrebni za pripremu amplifikacije, PCR pufer s ionima  $Mg^{2+}$ , deoksiribonukleotid-trifosfati (dNTP-ovi) te Taq polimeraza, izmiješani su i spremni za upotrebu te aliktivirani za pojedinačno testiranje u FluoMix. Za svaki test uzima se po jedna PCR pločica i bočica FluoMixa [163].

Princip pripreme PCR pločice jednak je za sve testove RBC-FluoGene. Nakon otapanja PCR pločice i bočice FluoMixa prethodno pohranjenih u zamrzivaču na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  te uzoraka DNA ispitanika, najprije je u negativnu kontrolnu jažicu pipetiran FluoMix (7,5  $\mu\text{l}$ ) te je dodano i 7,5  $\mu\text{l}$  deionizirane vode. Zatim je u ostatak FluoMixa dodana DNA

koncentracije 1 ng/μl (±50 %), čiji volumen ovisi o testu koji se radi. Nakon miješanja FluoMixa i DNA po 15 μl alikvota pipetirano je u svaku specifičnu jažicu na PCR pločici. Broj specifičnih reakcija ovisi o testu koji se radi. Pločica je na kraju prekrivena prozirnom optičkom folijom radi sprečavanja evaporacije reakcijske smjese i DNA iz jažica tijekom PCR reakcije, a istovremeno omogućavajući mjerenje intenziteta fluorescencije detektorima uređaja FluoQube.

Protokol PCR reakcija jednak je za sve testove RBC-FluoGene:

- početna denaturacija – 96 °C, 2 minute;
- 40 ciklusa:
  - denaturacija – 96 °C, 15 sekundi;
  - hibridizacija i elongacija – 60 °C, 49 sekundi.

Po završetku elongacijskog koraka svakog od 40 ciklusa PCR reakcije, mjeren je intenzitet fluorescencije u detektorima:

- “blue” – ekscitacija 470 nm, detekcija 520 nm – fluorokrom FAM
- “green” – ekscitacija 515 nm, detekcija 545 nm – fluorokrom JOE
- “orange” – ekscitacija 565 nm, detekcija 605 nm – fluorokrom ROX

Brzina promjene temperature (engl. *ramp speed*) između pojedinih koraka protokola PCR reakcija mora biti 1,5 °C/s. Po završetku PCR reakcija, u pravilu za sat vremena, rezultati su spremni za automatsko učitavanje u FGSW za analizu rezultata. Nakon pregleda i interpretacije rezultata te njihove verifikacije u FGSW-u testiranje je završeno.

#### **3.4.3.1. Probirni test za *RHD***

Probirni test za molekularnu potvrdu serološki RhD negativnih uzoraka fenotipa ccee prema algoritmu 1 plana istraživanja bio je RBC-FluoGene D-Screen. Tim se testom paralelno trima istovremenim PCR reakcijama određuju polimorfizmi karakteristični za tri egzona gena *RHD* prema slijedu nukleotida u alelu *RHD\*01* (opis u Prilogu 1). Egzoni 3, 5 i 10 gena *RHD* odabrani su kako bi tim probirnim testom bilo moguće detektirati što veći broj alela *RHD* [60,76]. Pritom je oligonukleotidna proba za SNV egzona 10 označena fluorokromom 1, a obje probe za SNV egzona 3 i 5 označene su jednakim fluorokromom 2, pa nije moguće razlikovati reaktivnosti egzona 3 i 5. Proba za internu kontrolu (*HGH*) označena je fluorokromom 3 [163]. Prema algoritmu testiranja, utvrdi li se probirnim testom pozitivna reakcija bilo kojeg od triju egzona gena *RHD*, uzorak se dodatno testira radi definiranja alela *RHD*.

### 3.4.3.2. Test za proširenu tipizaciju alela sustava Rh

RBC-FluoGene CDE eXtend bio je prvi test prema algoritmu 2 plana istraživanja. Popis alela i karakterističnih polimorfizama koji se mogu odrediti nalazi se u Prilogu 2.

Test ima više karakterističnih parova početnica i proba, sa sljedećim funkcijama:

#### A) određivanje polimorfizama u genu *RHCE*

Potvrđuje polimorfizme koji kodiraju antigene C, c, E i e. Osim njih, ovdje se nalaze i probe za SNV u alelima *RHCE*: c.122A>G (za alele *RHCE*\*02.08 koji kodiraju antigen C<sup>w</sup>), c.733C>G, c.1006G>T. Ističu se i probe za definiranje sekvence alela *RHCE* na poziciji c.48: c.48G i c.48G>C.

Glavni aleli gena *RHCE* ne mogu biti eksplicitan rezultat testiranja metodom qPCR. O njihovoj prisutnosti može se zaključiti dedukcijom ili na temelju dobivenih rezultata serološkog testiranja ili rezultata molekularnog testiranja polimorfizama odgovornih za ekspresiju antigena na proteinu RhCE (C, c, E, e) i njima definiranog Rh-fenotipa te posljedično i genotip(ov)a koji kodira(ju) ekspresiju pojedinog fenotipa. U situaciji kad ne postoji bijektivan odnos između genotipa *RHCE* i fenotipa (koji postoji za većinu RhD negativnih fenotipova), za rutinsko određivanje alela gena *RHCE* u transfuzijskoj je medicini uobičajen postupak upotrebljavati podatke o učestalosti genotipova *RHCE*, koji su u literaturi najčešće navedeni kao učestalost haplotipova gena *RHCE* s genom *RHD* (Tablica 3).

#### B) određivanje polimorfizama u genu *RHD*

Ova skupina reakcija se zbog lakše interpretacije rezultata dijeli u tri podskupine:

1. reakcije za specifično određivanje karakterističnih polimorfizama pojedinih egzona *RHD*, za što u testu postoje tri „bloka“ reakcija:
  - a. Određivanje specifičnih polimorfizama u slijedu nukleotida alela *RHD*\*01 unutar svakog od deset egzona *RHD* (osim egzona 8, unutar kojeg je polimorfnost u odnosu na *RHCE* minimalna [60]). Takva konfiguracija namijenjena je i otkrivanju hibridnih alela u sustavu Rh, a test daje informaciju o tome koji egzoni u njima potječu od gena *RHD*. U ovom bloku testira se i polimorfizam za alel *RHD*\*08N.01 (*RHD*\*Ψ) [94], relativno čest u RhD negativnih osoba afričkog porijekla.
  - b. DAU-polimorfizam, aleli skupine *RHD*\*10, koje sve karakterizira c.1136C>T u egzonu 8. Ovaj blok reakcija uključuje polispecifičnu

DAU-probu za c.1136C>T (time i sve podtipove alela *RHD\*10*), specifične probe za *RHD\*10.01* (DAU1), dvije polispecifične probe za polimorfizme u *RHD\*10.02* (DAU2) / *\*.06* (DAU6) / *\*.07* (DAU7) te *RHD\*10.03* (DAU3) / *\*.07* (DAU7) / *\*.11* (DAU11).

- c. Tzv. CATPA blok (engl. *categories and partials block*). Parcijalni antigeni D nekad su bili podijeljeni u kategorije (danas se to smatra arhaizmom). Aleli onih parcijalnih antigena D čija je molekularna osnova SNV (poput alela skupine *RHD\*07*) ne mogu biti otkriveni karakterističnim polimorfizmima za egzone *RHD*. Zbog toga se u CATPA bloku određuju specifični polimorfizmi određenih alela *RHD*. Primjer je parcijalni antigen DNB, kodiran alelom *RHD\*25* (*RHD\*DNB*), koji se od *RHD\*01* razlikuje u samo jednom SNV-u, c.1063 G>A (p.Gly355Ser) u egzonu 7 gena *RHD* [92].
2. reakcije za specifično određivanje alela fenotipa slabog D. Testom se definiraju najčešći aleli fenotipa slabog D u populacijama europskog porijekla, oni za slabi D tipova 1, 2 i 3 (*RHD\*01W.1*, *\*01W.2*, *\*01W.3*), parcijalni aleli *RHD* sa slabom ekspresijom (*RHD\*15* i *\*11* u haplotipu *cDe*), globalno najčešći DEL aleli (*RHD\*01EL.01*, *\*01EL.08* i *\*11* u haplotipu *CDe*) i neki rjeđi aleli.
  3. reakcije za nespecifičnu potvrdu varijanti gena *RHD* (Tablica 5). Ovo je klinički najvažnija karakteristika testa, jer omogućuje potvrdu alela *RHD* i onda kad se kombinacijom ostalih reakcija ne može točno specificirati o kojem se alelu radi.
    - a. Probama „non-DAU“ određuje se divlji tip sekvence c.1136C, prisutan u svim do danas opisanim alelima *RHD* koji **ne** pripadaju grupi DAU [60]. Time se omogućuje potvrda prisutnosti bilo kojeg alela *RHD* izvan DAU-alela. To vrijedi i za još neopisane alele *RHD*, u rezultatu kojih se potencijalno mogu uočiti različiti nesukladni uzorci ostalih reakcija u testu.
    - b. Tri „non-probe za slabi D tip 4“ i njihovi specifični parovi koji odgovaraju polimorfizmima za karakterizaciju klinički najznačajnijih i najčešćih alela u filogenetskoj grupi slabog D tipa 4. Osnovna im je funkcija pravilna raspodjela alela skupine *RHD\*09*, odgovornih za DAR fenotipove (ranije nazivani slabi D tip 4 s podtipovima 4.1, 4.2, 4.3). Međutim, „non-probe“ omogućuju i detekciju bilo kojeg drugog alela *RHD* koje test ne može specifično definirati. Negativni rezultat svih specifičnih reakcija, uključujući i „non-probe“, implicitno pokazuje da u DNA nije prisutan gen *RHD* (što gotovo uvijek upućuje na deleciju *RHD* na oba homologna kromosoma 1).



**Tablica 5.** Probe za nespecifičnu potvrdu alela *RHD* u testu RBC-FluoGene CDE eXtend.

Oligonukleotidna proba	SNV u <i>RHD</i>	Naziv alela <i>RHD</i>	Fenotip
RHD*09.04-c.48G>C	c.48G>C	<i>RHD*09.04</i> , <i>RHD*01.01</i> , <i>RHD*10.13</i>	Slabi D tip 4.1 (DAR4) D pozitivan, DAU
non-RHD*09.04-c.48G	c.48G	Svi aleli <i>RHD</i> osim <i>RHD*09.04</i>	Razni
RHD*09.05-c.872C>G	c.872C>G	<i>RHD*09.05</i>	Slabi D tip 4.3 (DAR5)
non-RHD*09.05-c.872C	c.872C	Svi aleli <i>RHD</i> osim <i>RHD*09.05</i>	Razni
RHD*09.01-c.1025T>C	c.1025T>C	<i>RHD*09.01.01/01.02/01.03</i> <i>RHD*09.02.00/01</i> <i>RHD*09.06</i>	Slabi D tip 4.2.1/4.2.2/4.2.3 DAR2 (DARE)/DAR2.1 DAR6
non-RHD*09.01-c.1025T	c.1025T	Svi aleli <i>RHD</i> osim <i>RHD*09.01.01-03</i> , <i>*09.02.00-01</i> , <i>*09.06</i>	Razni
D-1136C-1 (non-DAU-1)	c.1136C	Svi aleli <i>RHD</i> osim skupine <i>RHD*10</i>	Razni, osim DAU
D-1136C-2 (non-DAU-2)	c.1136C	Svi aleli <i>RHD</i> osim skupine <i>RHD*10</i>	Razni, osim DAU

Tablica je pojednostavljeni izvadak popisa alela iz Priloga 2. Polimorfizmi mogu biti prisutni i u drugim rijetkim varijantama gena *RHD* navedenim u popisu u Prilogu 2.

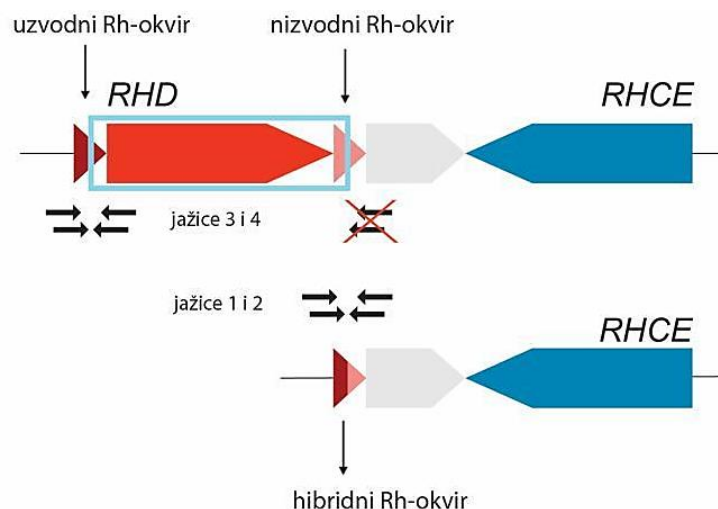
### 3.4.4. Test za određivanje zigotnosti lokusa *RHD* metodom PCR-SSP

Zigotnost lokusa *RHD* ispitanika s barem nekom od sekvenci *RHD* određivala se testom RBC-Ready Gene Zygofast. Test se temelji na metodi PCR-SSP uz evaluaciju rezultata elektroforezom amplikona u agaroznom gelu. Specifičnost reakcija ovog testa opisana je u Prilogu 3.

PCR-SSP je oblik *end-point* metode PCR-a u kojoj je isključivo slijed nukleotida na 3'-kraju početnice odgovoran za polimorfizam koji se može odrediti. Više se PCR reakcija provodi paralelno u jednoj ili više jažica. Uzorci u kojima se početnice vežu za svoju ciljnu sekvencu stvaraju specifični amplikon, a uzorci u kojima se početnice ne vežu za svoju ciljnu sekvencu ne stvaraju specifični amplikon, odnosno u tim uzorcima nedostaje ciljna sekvenca u DNA za taj specifični par početnica. Rezultat testiranja, amplikon, vizualizira se elektroforezom u agaroznom gelu. U električnom polju amplikoni putuju između elektroda kroz pore agaroze i mogu se razlikovati prema veličini. Veći amplikoni putuju sporije pa su u određenom trenutku bliže jažici od manjih amplikona koji brže prolaze kroz pore. Brzina amplikona proporcionalna je njihovoj veličini pa amplikoni jednake veličine putuju gelom istom brzinom te se stvaraju vrpce (engl. *bands*) koje se mogu vizualizirati pod ultraljubičastom svjetlosti. Za to služe reagensi koji interkaliraju između lanaca dvolančane DNA i emitiraju fluorescenciju u ultraljubičastom području. Nakon uspješne amplifikacije ciljna sekvenca DNA prisutna je u dovoljnom broju kopija što omogućuje uspješnu vizualizaciju vrpce u agaroznom gelu i fotografiranje za dokumentiranje rezultata.

Metodom PCR-SSP ne mogu se eksplicitno određivati delecije gena, jer rezultat mora biti amplifikacija neke postojeće unaprijed definirane ciljne sekvence DNA omeđene specifičnim početnicama [165]. Ako ciljna sekvenca ne postoji zbog delecije gena, nema amplifikacije. Zbog toga kao dokaz delecije cijelog gena *RHD*, *RHD\*01N.01*, služi karakteristična sekvenca DNA strukture hibridnog Rh-okvira (slike 6, 10 i 16).

Princip izvođenja testa su reakcije opisane u Prilogu 3, a prikazan je shematski na Slici 16. U četiri jažice testiraju se Rh-okviri u duplikatu zbog rijetkih polimorfizama opisanih u pojedinim populacijama u inače izrazito konzerviranim sekvencama Rh-okvira [166]. Sve jažice sadrže prealikvotirane i osušene mješavine početnica, specifične početnice (za hibridni ili uzvodni Rh-okvir) te za amplifikaciju interne kontrole (*HGH*). U neparnim jažicama specifični amplikoni su duljine 935/940 pb, a u parnim 1525 pb. Početnice u jažicama 3 i 4 vežu se za 5'- i 3'-kraj uzvodnog okvira. Ako u DNA postoji lokus *RHD*, postoji i sekvenca uzvodnog okvira pa će u tim jažicama doći do amplifikacije, čime se njima potvrđuje prisutnost nekog alela *RHD*. Početnice u jažicama 1 i 2 za hibridni okvir, koji je rezultat delecije gena *RHD*, vežu se za 5'-kraj uzvodnog okvira i 3'-kraj nizvodnog okvira. Amplikon hibridnog okvira nastaje samo od DNA kromosoma s delecijom gena *RHD*. Udaljenost između mjesta vezanja tih početnica velika je u DNA s genom *RHD*. Zato u uvjetima PCR reakcija u testu (vrsta i koncentracija Taq-polimeraze, trajanje elongacijskog ciklusa) u takvih DNA u jažicama 1 i 2 nema amplifikacije dvolančane DNA. Eventualno može nastati nešto jednolančanih DNA koje se ne mogu vizualizirati.



**Slika 16.** PCR reakcije u testu RBC-Ready Gene Zygofast. Početnice (označene strelicama) u jažicama 1 i 2 služe za dokaz hibridnog Rh-okvira, odnosno delecije *RHD*, a u jažicama 3 i 4 za dokaz prisutnosti uzvodnog Rh-okvira, odnosno lokusa *RHD* u testiranoj DNA.

Priprema PCR reakcija napravljena je po uputama proizvođača [167]. U reakcijsku mješavinu (engl. *mastermix*) za svaku od četiri jažice pipetirano je: 6  $\mu$ l deionizirane vode, 3  $\mu$ l pufera Ready PCR (sadrži pufer za PCR reakciju, dNTP-ove, ione  $Mg^{2+}$ ) i 0,08  $\mu$ l (0,4 U uz koncentraciju 5 U/ $\mu$ l) Taq polimeraze AxiTaq (*Inno-train Diagnostik*). Nakon miješanja dodan je 1  $\mu$ l DNA po jažici. Prema protokolu, DNA mora biti koncentracije 25 – 50 ng/ $\mu$ l, a radna pretpostavka za koncentraciju DNA izolirane u ovom istraživanju bila je 30 ng/ $\mu$ l. Nakon dodavanja DNA, u svaku od četiri jažice pipetirano je po 10  $\mu$ l reakcijske mješavine.

Amplifikacija je napravljena u uređaju TAdvanced 96 (*Analytik Jena*), validiranom za izvođenje testova RBC-Ready Gene (Tablica 6). Brzina promjene temperature između pojedinih koraka u protokolu PCR reakcija mora biti 4 °C/s [167].

**Tablica 6.** Protokol PCR reakcija za određivanje zigotnosti lokusa *RHD*.

Naziv koraka	Početna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija i elongacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Završna elongacija	Čuvanje
Temperatura	95 °C	95 °C	70 °C	95 °C	65 °C	72 °C	95 °C	61 °C	72 °C	72 °C	10 °C
Trajanje	2 min	20 s	60 s	20 s	60 s	45 s	20 s	50 s	45 s	2 min	+∞
Broj ciklusa	1	5		10			20			1	1

Elektroforeza je napravljena u sustavu za elektroforezu agaroznih gelova ORIGINS™ (*Elchrom Scientific*, Švicarska) u komercijalnom gelu koji sadrži etidijev bromid, PCR CheckIT™ Mini (*Al-Diagnostic*, Austrija) [168]. Agarozni gelovi proizvedeni su geliranjem i simultanim povezivanjem hidroksilnih grupa agaroze i oksiranskih grupa 1,4-butandioldiglicidil-etera te su optički prozirni. U jažice na gelu pipetiran je cijeli volumen amplikona (10  $\mu$ l). Kao pufer za elektroforezu upotrebljavan je 30 mM TAE. Elektroforeza je provedena pri temperaturi od 20 °C, uz napon istosmjerne struje 120 V (jakosti struje 300-400 mA), 20 minuta. Rezultati su vizualizirani snimkom digitalne fotografije gela u sustavu za dokumentaciju gelova InGenius 3 (*Syngene*, Velika Britanija), koji sadrži kameru od 3 megapiksela i UV/VIS transiluminator (emisija na valnoj duljini od 254 nm, u spektralnom području etidijeva bromida).

Rezultati su interpretirani uspoređivanjem uzorka reakcija na fotografiji gela s uzorkom reakcija iz Priloga 3. Moguće je dobiti tri rezultata testiranja:

- a) homozigot za lokus *RHD* – pozitivne su isključivo reakcije za uzvodni okvir (3 i 4). Na oba kromosoma 1 prisutan je lokus *RHD*. To ne znači nužno da su oba alela *RHD* jednaka, već samo da na oba kromosoma 1 postoji lokus *RHD* s nekim alelom *RHD* (alternativna nomenklatura D/D).
- b) hemizigot za lokus *RHD* – pozitivne su sve reakcije za uzvodni okvir i hibridni okvir (1, 2, 3 i 4). Rezultat je posljedica genotipa koji uključuje deleciju gena *RHD* (*RHD\*01N.01*) i bilo koju varijantu gena *RHD* (alternativna nomenklatura D/d).
- c) homozigot za deleciju gena *RHD* (*RHD\*01N.01*) – pozitivne su isključivo reakcije za hibridni okvir (1 i 2). Rezultat je dokaz delecije gena *RHD* na oba kromosoma 1 (alternativna nomenklatura d/d).

### 3.4.5. Sekvenciranje DNA

Sekvenciranje po Sangeru DNA sekvenci egzona i susjednih intronskih područja gena *RHD* napravljeno je modificiranim protokolom testa SuBiTo za sekvenciranje alela HLA (*Inno-train Diagnostik*) [169]. Metoda sekvenciranja po Sangeru ima nekoliko stupnjeva. Početnom PCR reakcijom odabiru se odsječci genomske DNA za sekvenciranje; ovdje su to egzoni *RHD* sa susjednim dijelovima introna. Nakon pročišćavanja amplikona (ostaci dNTP-ova, enzima i sl.) slijedi novi ciklus PCR reakcija za sekvenciranje s mješavinama standardnih dNTP-ova i ddNTP-ova. Poseban fluorokrom obilježava svaki od četiri različita ddNTP-ova. Njihovom ugradnjom u novi lanac DNA prestaje sinteza tog lanca (zato je komercijalni naziv BigDye Terminators). Za svaki nukleotid u istraživanoj sekvenci određen broj novougrađenih nukleotida potječe od ddNTP-ova. Pojedine nastale DNA različitih su veličina te se međusobno razdvoje kapilarnom elektroforezom u akrilamidnom gelu. Molekule DNA u koje se ddNTP inkorporirao ranije kreću se gelom brže, jer su kraće, a DNA u koje se ddNTP inkorporirao kasnije gelom putuju sporije, jer su dulje. Laserom se detektiraju valne duljine emisija fluorokroma koje ukazuju na slijed nukleotida istraživane sekvence DNA, jer su fluorokromi različiti za svaki od četiri nukleotida.

Početna PCR reakcija sekvenciranja napravljena je u uređaju TAdvanced 96 (*Analytik Jena*), prema protokolu opisanom u Tablici 7.

**Tablica 7.** Protokol početne PCR reakcije pri sekvenciranju egzona gena *RHD*.

Naziv koraka	Početna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Čuvanje
Temperatura	94 °C	94 °C	65 °C	72 °C	95 °C	61 °C	72 °C	4 °C
Trajanje	2 min	15 s	90 s	90 s	15 s	60 s	2 min	+∞
Broj ciklusa	1	10			25			1

Početnice za početnu PCR reakciju upotrebljavale su se u ranijim istraživanjima, a opisane su u Tablici 8 [87]. Ukupno je bilo 9 reakcija (jažica) za amplifikaciju svih 10 egzona i susjednih intronskih sekvenci gena *RHD*. Egzoni 4 i 5 amplificirani su jednim setom početnica u reakciji 4 (nastaje jedan ampikon koji obuhvaća sekvence oba egzona). Konačni volumen reakcijske mješavine bio je 75  $\mu$ l, s koncentracijom svakog od dNTP-a 200  $\mu$ m/L, 250 ng genomske DNA.

**Tablica 8.** Početnice početne PCR reakcije sekvenciranja egzona *RHD*. Prilagođeno prema [87].

Reakcija	Naziv početnice	Slijed nukleotida početnice 5'→3'	Egzon <i>RHD</i>	Položaj u <i>RHD</i>	Smjer	Duljina ampikona (pb)
1	RHDpro-132F	GTAACTCCATAGAGAGGCCAGCAGAA	1	5'UTR	F	902
	RHD_i1+578R	ATGGTGGTGCCCTCTGTGGTC	1	Intron 1	R	
2	nRHD_i1-1405F	CATTTCCCTATTTAACAGACAAGAACAAG	2	Intron 1	F	1710
	RHD_i2+61R	GGCAATATCCAGATCTTCTGGAACC	2	Intron 2	R	
3	RHD_i2-182F	AGGCCACCTTAACGGGAGAAGAG	3	Intron 2	F	677
	RHD_i3+301R	GCTATGTTGCCAGCTCGGTCC	3	Intron 3	R	
4	nRHD_i3-45F	AAGGACTATCAGGGCTTGCCCCGTGC	4 i 5	Intron 3	F	983
	RHD_i5+149R	CCACTGTGACCACCAGCATCCTA	4 i 5	Intron 5	R	
5	nRHD_i5+1463F	AGGCAGTAGCGAGCTGGCCCCCTCA	6	Intron 5	F	554
	nRHD_i6+57R	GCACTGCACAGTGGCCCATCAGGTCC	6	Intron 6	R	
6	RHD_i6-160F	CTCTTCATTTCAACAACTCCCCGA	7	Intron 6	F	665
	RHD_i7+326R	TGGGAGCACGTCCACAGCAAAG	7	Intron 7	R	
7	RHD_i7-327F	TGGAGGCTCTGAGAGTTGCGG	8	Intron 7	F	603
	nRHD_i8+151R	GCCTCACAGTCCACATTAGCAGCAG	8	Intron 8	R	
8	RHD_i8-67F	TGAGATACTGTCGTTTTGACACACAATACTTC	9	Intron 8	F	268
	RHD_i9+62R	GTTTTACTCATAAACAGCAAGTCAACATATATCCT	9	Intron 9	R	
9	RH <i>i</i> 9-417F	CACTCCAGCCTGAGACAAGAGCGAAAC	10	Intron 9	F	567
	DEX10-SP-1358-as	CAGTGCTGCGGAACATTG	10	3'UTR	R	

F = od engl. *forward* – početnica za sintezu lanca DNA s nekodirajućeg (engl. *antisense*) lanca DNA  
R = od engl. *reverse* – početnica za sintezu lanca DNA s kodirajućeg (engl. *sense*) lanca DNA

Pročišćavanje produkata PCR reakcije izvedeno je reagensom ExoSAP-IT (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) koji je pipetiran u amplikone volumena 3  $\mu$ l, uz inkubaciju 15 minuta pri 37 °C. ExoSAP-IT čine dva hidrolitička enzima, egzonukleaza I i alkalna fosfataza škampa (akronim od engleskih naziva enzima *Exonuclease I* i *Shrimp Alkaline Phosphatase*). Egzonukleaza I razgrađuje zaostale jednolančane početnice i bilo koju jednolančanu DNA nastalu PCR reakcijom. Alkalna fosfataza razgrađuje zatim sve nukleotide na nukleozide i anorganski fosfat. Nastali dvolančani amplikoni ostaju nedirnuti. Nakon inkubacije termolabilni enzimi inaktivirani su pri 85 °C, 15 minuta.

Zatim je slijedila priprema PCR reakcija za sekvenciranje. U reakcijsku mješavinu pipetirano je 7,5  $\mu$ l mješavine dNTP-ova i početnica za sekvenciranje (Tablica 9), 0,5  $\mu$ l fluorescencijski označenih ddNTP-ova (BigDye<sup>®</sup> Terminators, *Thermo Fisher Scientific*), te 2  $\mu$ l pročišćenog amplikona početnog PCR-a, za ukupni volumen 10  $\mu$ l.

**Tablica 9.** Početnice PCR reakcije za sekvenciranje egzona gena *RHD*. Prilagođeno prema [87].

Naziv početnice	Slijed nukleotida početnice 5'→3'	Egzon <i>RHD</i>	Položaj u <i>RHD</i>	Smjer
SYpro-118F	CACAGCCAGCCTTGCAGCC	1	5'UTR	F
SYi1-147F	ATTCAGTTGAGAACATTGAGGC	2	Intron 1	F
SYi2-151F	GAGATGGTCACTCCACTCTGTAG	3	Intron 2	F
SYi4+103R	TGATGGAAGGGCTTCAGACACC	4	Intron 4	R
SYi5+127R	CCTAGAGTCCACTGTAGAGGC	5	Intron 5	R
SYi5-149F	TCCACTGATGAAGGACACGTAG	6	Intron 5	F
SYi6-130F	GTGCACATCAAGTCTGAGAAG	7	Intron 6	F
SYi7-121F	ATGTACCAGCCAGGGAGAGGAC	8	Intron 7	F
SYi9-58R	CAAGTCAACATATATACCCAGG	9	Intron 9	R
SYi9-119F	TCCAAGATCTCTCCAATTCAG	10	Intron 9	F

F = od engl. *forward* – početnica za sintezu lanca DNA s nekodirajućeg (engl. *antisense*) lanca DNA

R = od engl. *reverse* – početnica za sintezu lanca DNA s kodirajućeg (engl. *sense*) lanca DNA

Amplifikacija u uređaju TAdvanced 96 (*Analytik Jena*) napravljena je po protokolu:

- početna denaturacija – 96 °C, 1 minuta;
- 25 ciklusa:
  - denaturacija – 96 °C, 10 sekundi;
  - hibridizacija – 50 °C, 5 sekundi;
  - elongacija – 60 °C, 90 sekundi.

Nakon pročišćavanja amplikona za sekvenciranje (puferom s 1,5 M natrijevog-acetata i 250 mM EDTA) i precipitacije etanolom (uz centrifugiranje i dekantiranje supernatanta), amplikoni su otopljeni u 0,3 mM otopini EDTA i bili spremni za sekvenciranje. Fluorescencijski označeni odsječki DNA analizirani su kapilarnom elektroforezom. Proces je automatiziran u uređaju Applied Biosystems 3730 Genetic Analyzer (*Thermo Fisher Scientific*), uz polimer POP7 (*Thermo Fisher Scientific*). Rezultati su bili analizirani u programu HiType (*Inno-train Diagnostik*).

Dobivene sekvence DNA uspoređivane su s referentnom sekvencom za gen *RHD* u bazi sekvenci GenBank RefSeq NG\_007494.1 [14] te s referentnom sekvencom Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 13 (GRCh38.p13) za kromosom 1 (GenBank GCA\_000001405.28 [14]), a utvrđeni polimorfizmi i s bazom genoma gnomAD [170] te bazama alela *RHD* Rhesusbase [60] i RHeference [76].

### 3.5. Test adsorpcije i elucije

Uzorci ispitanika s utvrđenom varijantom gena sustava Rh naknadno su testirani testom adsorpcije i elucije u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Testom se u eluatu određuje specifičnost antieritrocitnih protutijela prethodno adsorbiranih na eritrocite ispitanika. Svrha testa je provjera jesu li na membrani eritrocita prisutni antigeni D slabog D ili DEL fenotipa.

Adsorpcija i elucija protutijela anti-D s eritrocita napravljene su prema metodi za dokazivanje antigena D slabe ekspresije [171]. Najprije su eritrociti ispitanika inkubirani 60 minuta na 37 °C s reagensom Anti-D (Human Monoclonal-Polyclonal Blend) BioClone (*Ortho-Clinical Diagnostics*, SAD). Reagens sadrži mješavinu monoklonskih IgM i poliklonskih IgG protutijela anti-D. Za eluciju vezanih protutijela anti-D s eritrocita upotrebljavan je kit za kemijsku eluciju, Gamma ELU-KIT (*Immucor*, SAD), prema uputama proizvođača.

U testiranju je primjenjena pozitivna i negativna kontrola. Pozitivna kontrola bila je mješavina D-pozitivnih i D-negativnih eritrocita prema navedenoj metodi [171]. Negativnu kontrolu činili su eritrociti istog fenotipa kao i u istraživanih uzoraka (Rh-fenotip dCcee).

Za indirektni antiglobulinski test upotrebljavane su kartice Polyspecific, anti-IgG, anti-C3d (*Ortho-Clinical Diagnostics*). Za identifikaciju antieritrocitnih protutijela u eluatu upotrebljavani su 0,8 %-tni jedanaeststanični testni eritrociti obrađeni i neobrađeni enzimom u panelu RESOLVE™ Reagent Red Blood Cells: Panel C (*Ortho-Clinical Diagnostics*). Kako bi se utvrdilo je li protutijelo anti-D otkriveno u eluatu bilo prethodno adsorbirano na eritrocite i ne predstavlja nevezano slobodno protutijelo u serumu, istovremeno s eluatom testiran je i zadnji supernatant u postupku ispiranja.

### 3.6. Statističke metode

Za određivanje učestalosti ispitanika s alelom *RHD* unutar serološki RhD negativnih uzoraka, uz pouzdanost istraživanja od 95 %, bilo je potrebno testirati najmanje 667 ispitanika, uz konzervativnu procjenu učestalosti 0,1 %. Razina značajnosti istraživanja postavljena je na  $\alpha = 0,05$ .

Formula za izračun minimalnog potrebnog broja uzoraka u istraživanju,  $n$  [172]:

$$n = \left(\frac{z}{E}\right)^2 \cdot p \cdot q$$

$z$  = standardizirana vrijednost normalne raspodjele = 1,96;

$E$  = pogreška procjene = 0,24 %;

$p$  = procjena učestalosti = 0,1 %;

$q = 1 - p = 99,9$  %.

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kategorijski podaci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Izravnim brojenjem utvrđene su apsolutne frekvencije sljedećih kategorijskih podataka: broj antigena, alela, fenotipova, haplotipova i genotipova. Formule za izračun relativnih frekvencija prikazane su pri kraju potpoglavlja.

Razlike brojčanih varijabli testirane su  $\chi^2$  - testom, te, po potrebi, Fisherovim egzaktnim testom.

Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkim programima MedCalc Statistical Software version 20.027 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) i SPSS Statistics 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.).



Učestalost alela izražena je kroz dvije kategorije:

$$\text{učestalost alela} = \frac{\text{broj pojedinog alela}}{\text{ukupan broj alela u populaciji}}$$

$$\text{učestalost ispitanika s alelom} = \frac{\text{broj ispitanika s određenim alelom}}{\text{ukupan broj ispitanika}}$$

Istovrsne formule upotrijebljene su za izračune učestalosti antigena C, c, E i e te učestalosti haplotipova *RHD-RHCE*.

Varijabla *ukupan broj alela u populaciji* definirana je na sljedeći način:

$$\text{ukupan broj alela u populaciji} = 2 \cdot (\text{ukupan broj ispitanika})$$

Iako ova definicija može izgledati aksiomska i nepotrebna, zbog matematičke preciznosti je nužna. U ispitivanoj populaciji RhD negativnih davatelja krvi gotovo svi ispitanici imaju deleciju lokusa *RHD* pa uopće nemaju nijedan alel *RHD*. Zbog toga se ukupnim brojem alela u populaciji pri definiciji učestalosti alela *RHD* ne smatra *de facto* zbroj svih alela *RHD* pronađenih u ispitivanoj populaciji, već ukupan potencijalni broj alela, kao da svi ispitanici imaju po dva lokusa *RHD* u svom diploidnom genomu, što odgovara navedenome u definiciji varijable. Samo je na taj način izračunata učestalost klinički značajna.

Učestalost genotipova i fenotipova određena je prema formuli:

$$\text{učestalost genotipa (ili fenotipa)} = \frac{\text{broj određenog genotipa (ili fenotipa)}}{\text{ukupan broj ispitanika}}$$

## 4. REZULTATI

### 4.1. Serološko određivanje antigena sustava Rh

Serološkim ispitivanjem u obje upotrebljavane tehnike, u direktnoj aglutinaciji i u indirektnom antiglobulinskom testu, među svih 704 ispitanika dobiven je negativan rezultat u određivanju antigena D.

Rezultate serološkog određivanja antigena C/c i E/e prikazuje Tablica 10.

Na eritrocitima svih ispitanika dokazan je antigen e. U 703/704 ispitanika (99,86 %) dokazan je antigen c. Klinički je važna i učestalost antigena C i/ili E u populaciji RhD negativnih davatelja krvi. U ovom istraživanju prisutnost antigena C i/ili E dokazana je u 115 (16,34 %) ispitanika.

**Tablica 10.** Raspodjela klinički najznačajnijih antigena proteina RhCE u populaciji RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske.

Antigen	Broj ispitanika s antigenom (učestalost, %)	Broj antigena u ispitivanoj populaciji (učestalost pojedinog antigena iz para antitetičkih antigena, %)
<b>C</b>	90 (12,78)	91 (6,46)
<b>c</b>	703 (99,86)	1317 (93,54)
<b>E</b>	27 (3,84)	27 (1,92)
<b>e</b>	704 (100,00)	1381 (98,08)
<b>Ukupno</b>	704	1408 parova antitetičkih antigena (C/c, E/e)

## 4.2. Molekularno određivanje alela sustava Rh

### 4.2.1. Molekularno testiranje alela *RHCE*

Tablica 11 prikazuje raspodjelu i učestalost serološki utvrđenih Rh-fenotipova te njihov odnos s genotipom *RHCE* u ispitanika. Serološki dokazan Rh-fenotip opisan je u toj tablici zbog ključne uloge u algoritmu za nastavak istraživanja molekularnim testiranjem.

Uzorci svih ispitanika sa serološki utvrđenim fenotipom ccee (c+e+), koji je kodiran homozigotnošću alela *RHCE\*01*, te koji su ujedno u probirnom testu za tri egzona *RHD* bili negativni, u ovom istraživanju, u pravilu, nisu bili potvrđivani metodom qPCR za polimorfizme odgovorne za ekspresiju antigena C/c i E/e. Takvih uzoraka bilo je 589 (83,66 %) i ti ispitanici sigurno imaju isključivo alel *RHCE\*01*. Radi kontrole takva pristupa u nasumično odabраних 15 uzoraka potvrđen je isključivo alel *RHCE\*01* testom RBC-FluoGene CDE eXtend. Za tih 589 ispitanika tako je iz serološki utvrđenog fenotipa ccee zaključen i genotip koji ga kodira: *RHCE\*01 / RHCE\*01*.

Od ostalih 115 ispitanika (16,34 %), njih je 111 (15,77 %) potvrđeno kao heterozigoti, i to *RHCE\*01 / RHCE\*02* ili *RHCE\*01 / RHCE\*03*. Jedan ispitanik (0,14 %) potvrđen je kao homozigot *RHCE\*02 / RHCE\*02*. U dva su ispitanika (0,28 %) metodom qPCR definirani svi polimorfizmi karakteristični za četiri klinički značajna antigena na proteinu RhCE (C, c, E i e). Na temelju podataka o učestalosti haplotipova pretpostavljeni genotip tih dvaju ispitanika jest *RHCE\*02 / RHCE\*03*, a ne *RHCE\*01 / RHCE\*04*.

**Tablica 11.** Odnos fenotipa C, c, E, e i genotipa *RHCE* u populaciji serološki RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske.

Rh-fenotip		ccee	Ccee <sup>a</sup>	ccEe	CcEe	CCee	Ostali fenotipovi	Ukupno		
Genotip <i>RHCE</i>	Službena nomenklatura (ISBT)	<i>RHCE*01 / RHCE*01</i>	<i>RHCE*01 / RHCE*02</i>	<i>RHCE*01 / RHCE*03</i>	<i>RHCE*02 / RHCE*03</i>	<i>RHCE*02 / RHCE*02</i>				
	Alternativna nomenklatura	<i>ce/ce</i>	<i>Ce/ce</i>	<i>cE/ce</i>	<i>Ce/cE</i>	<i>Ce/Ce</i>				
Broj ispitanika, N		589	87	25	2	1	0	704		
Učestalost Rh-fenotipa, %		83,66	12,36	3,55	0,28	0,14	0,00	100,00		

<sup>a</sup> Uključuje i ispitanika s hibridnim alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* na temelju serološkog rezultata te polimorfizama u genu *RHCE* koji kodiraju antigene C, c i e potvrđenih metodom qPCR.

U preostalom jednom uzorku (0,14 %), metodom qPCR potvrđeni su najprije polimorfizmi koji kodiraju antigene C, c i e na proteinu RhCE. Analizom i ostalih rezultata ovog ispitanika (potpoglavlje 4.3.3.) utvrđeno je da se ne radi o heterozigotu *RHCE\*01,\*02*, već ispitanik ima hibridni alel strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*. S obzirom na rezultat kojim su potvrđeni polimorfizmi odgovorni za ekspresiju antigena C, c i e, taj je ispitanik u Tablici 11 uključen u skupinu heterozigota *RHCE\*01 / RHCE\*02*.

Metodom qPCR u potpunosti je potvrđen rezultat serološkog ispitivanja Rh-fenotipa u svih 704 ispitanika. Ni serološkim niti DNA metodama u ispitivanom uzorku davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske nije pronađen niti jedan od preostalih mogućih Rh-fenotipova.

Aleli *RHCE* utvrđeni u populaciji RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske i njihova učestalost prikazani su u Tablici 12. Uz napomenu da se za fenotipove CcEe radilo o dedukciji prema učestalosti genotipova *RHCE*, među četiri glavna alela *RHCE* u ispitivanoj populaciji nije pronađen niti jedan alel *RHCE\*04 (RHCE\*CE)*. Najveća je učestalost alela *RHCE\*01* (91,62 %), dok su ostala dva alela *RHCE* značajno slabije zastupljena (*RHCE\*02* sa 6,46 % i *RHCE\*03* s 1,92 %). Velika većina od ukupno 704 ispitanika, njih 701 (99,57 %) ima alel *RHCE\*01*, alel *RHCE\*02* prisutan je u 12,78 %, a alel *RHCE\*03* u 3,84 % ispitanika.

**Tablica 12.** Pregled utvrđenih glavnih alela *RHCE* odgovornih za ekspresiju antigena C, c, E i e, uz učestalost u ispitivanoj populaciji.

Alel <i>RHCE</i>	Broj alela <i>RHCE</i> u ispitivanoj populaciji (učestalost, %)	Broj ispitanika s alelom <i>RHCE</i> (učestalost, %)
<i>RHCE*01</i>	1290 (91,62)	701 (99,57)
<i>RHCE*02</i> <sup>a,b</sup>	91 (6,46)	90 (12,78)
<i>RHCE*03</i> <sup>a</sup>	27 (1,92)	27 (3,84)
<i>RHCE*04</i>	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>Ukupno</b>	1408 (100,00)	704 (100,00)

<sup>a</sup> U ispitivanoj populaciji dva su uzorka fenotipa CcEe s pretpostavljenim genotipom Ce/cE (*RHCE\*02 / RHCE\*03*).

<sup>b</sup> Uključuje i hibridni alel strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*.

#### 4.2.2. Molekularno testiranje alela *RHD*

Svih 704 uzoraka DNA ispitanika testirano je za alele *RHD* pojedinačno metodom qPCR prema planu istraživanja – probirnim testom za *RHD* ili testom za proširenu tipizaciju alela sustava Rh, ovisno o Rh-fenotipu pojedinog ispitanika. Raspodjela alela *RHD* s pridruženim alelima *RHCE* u haplotipu prikazana je u Tablici 13.

**Tablica 13.** Raspodjela alela *RHD* s haplotipski pridruženim alelima *RHCE* u populaciji RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske.

Fenotip		<u>Delecija gena <i>RHD</i></u> N (učestalost ispitanika bez alela <i>RHD</i> , %)	<u>Prisutan gen <i>RHD</i></u> N (učestalost ispitanika s alelom <i>RHD</i> , %)	Učestalost alela <i>RHD</i> u ispitivanoj populaciji (95 %-tni interval pouzdanosti) <sup>a</sup>	Ukupno, N (učestalost ispitanika, %)	
ccee		589 (83,66 %)	0 (0,00 %)	NP	589 (83,66 %)	
C+ i/ili E+	Ukupno	Učestalost u svih D– ispitanika	(16,05 %)	(0,28 %)	<b>0,14 %</b> ili <b>1 : 704</b> (1 : 5813 – 1 : 195)	(16,34 %)
		Učestalost u D– C/E+ ispitanika	113 (98,26 %)	2 (1,74 %)	<b>0,87 %</b> ili <b>1 : 115</b> (1 : 950 – 1 : 32)	115 (100,00 %)
	Prema fenotipu	Ccee	85 <sup>b</sup> (12,07 %)	2 (0,28 %)	<i>učestalost u svih D–</i> po <b>0,07 %</b> ili <b>1 : 1408</b> (1 : 55613 – 1 : 253) <i>učestalost u D– C/E+</i> po <b>0,43 %</b> ili <b>1 : 230</b> (1 : 9084 – 1 : 41)	87 (12,36 %)
		ccEe	25 (3,55 %)	0 (0,00 %)	NP	25 (3,55 %)
		CcEe	2 (0,28 %)	0 (0,00 %)	NP	2 (0,28 %)
		Ccee	1 (0,14 %)	0 (0,00 %)	NP	1 (0,14 %)
	Ukupno, N (učestalost ispitanika, %)		702 (99,72 %)	2 (0,28 %)	-	704 (100,00 %)

NP = nije primjenjivo

<sup>a</sup> 95 %-tni interval pouzdanosti određen prema Poissonovoj raspodjeli.

<sup>b</sup> Ispitanik s hibridnim alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* je dokazano homozigot za deleciju gena *RHD*. Serološki i testiranjem metodom qPCR u uzorku ispitanika potvrđeni su slijedom antigeni C, c i e odnosno polimorfizmi u genu *RHCE* koji ih kodiraju.

Od ukupno 704 ispitanika, njih 589 (83,66 %) homozigota za alel *RHCE\*01* bilo je nedvojbeno negativno za polimorfizme u sva tri egzona ispitivana probirnim testom. Nakon završetka testiranja tih ispitanika utvrđena im je delecija gena *RHD* (oznaka *d*) i genotip *RHD\*01N.01*, *RHCE\*01* / *RHD\*01N.01*, *RHCE\*01* (u haplotipskom obliku *dce/dce*). Učestalost alela *RHD* u skupini homozigota *RHCE\*01* iznosi 0,00 %.

Ostalih 115 ispitanika (16,34 %), fenotipski C- i/ili E-pozitivnih (oznaka u Tablici 13: C+ i/ili E+), koji na lokusu *RHCE* imaju barem jedan alel različit od *RHCE\*01* (Tablica 11) testirano je metodom qPCR testom za proširenu tipizaciju alela sustava Rh. Od 115 ispitanika njih 112 (15,91 % svih ispitanika) bilo je negativno za bilo koji od testiranih egzona *RHD*. Time je i za tih 112 ispitanika testiranje završeno te im je dokazana delecija gena *RHD* (oznaka *d*) i genotip *RHD\*01N.01*, *RHCE\*0X* / *RHD\*01N.01*, *RHCE\*0Y* (ovdje X i Y predstavljaju brojeke 1, 2 ili 3 za alel *RHCE*, ovisno o pojedinom ispitaniku).

Uzorci preostalih triju ispitanika (0,43 %) pokazivali su određenu reaktivnost barem nekih reakcija za egzone *RHD*. U jednog *RHD* negativnog ispitanika (0,14 %) utvrđen je hibridni alel *RHCE*, strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*. U dva hemizigotna uzorka za *RHD* fenotipa Ccee (0,28 %) sekvenciranjem gena *RHD* određen je DEL alel (*RHD\*01EL.32* i *RHD\*01EL.44*). Naknadnim serološkim testovima adsorpcije i elucije definitivno je potvrđen i DEL fenotip produkata obaju DEL alela. Učestalost ispitanika s alelom *RHD* iznosila je 0,28 % ili 1 : 352 (uz 95 %-tni interval pouzdanosti 1 : 2907 – 1 : 97). Ukupna učestalost alela *RHD* u ispitivanoj populaciji serološki RhD negativnih davatelja krvi iznosi 0,14 % ili 1 : 704 (uz 95 %-tni interval pouzdanosti 1 : 5813 – 1 : 195). Učestalost pojedinog alela *RHD* iznosi 0,07 % ili 1 : 1408 (uz 95 %-tni interval pouzdanosti 1 : 55613 – 1 : 253).

U populaciji RhD negativnih fenotipski C- i/ili E-pozitivnih ispitanika, kojima je barem jedan alel *RHCE* različit od *RHCE\*01* (ukupno 115 ispitanika), u njih 113 (98,26 %) nije prisutan gen *RHD*, odnosno dokazana im je delecija gena *RHD*. Preostala dva ispitanika s alelom *RHD* čine 1,74 % tako definirane populacije (što odgovara učestalosti ispitanika s alelom *RHD* u populaciji fenotipa C+ i/ili E+) ili 1 : 58 (uz 95 %-tni interval pouzdanosti 1 : 475 – 1 : 16). Ukupna učestalost alela *RHD* u RhD negativnih davatelja krvi koji su fenotipski C- i/ili E-pozitivni iznosi 0,87 % ili 1 : 115 (uz 95 %-tni interval pouzdanosti 1 : 950 – 1 : 32). Učestalost pojedinog alela *RHD* u populaciji ispitanika fenotipa C+ i/ili E+ iznosi 0,43 % ili 1 : 230 (uz 95 %-tni interval pouzdanosti 1 : 9084 – 1 : 41).

Ukupno su 702 ispitanika (99,72 %) *RHD* negativna (Tablica 13). Pretpostavka je da su *RHD* negativni kao posljedica delecije lokusa *RHD* na oba homologna kromosoma, što nije direktno dokazivano u svim uzorcima. U uzorcima 589 ispitanika fenotipa ccee (83,66 % ispitanika) dobiven je negativan rezultat za karakteristične polimorfizme egzona 3, 5 i 10 gena *RHD* u probirnom testu te je utvrđen *RHD* negativan rezultat. Delecija gena *RHD*, oznake *RHD\*01N.01*, izravno je dokazana u preostalim 113 ispitanika (16,05 %). U njih 112 delecija *RHD* dokazana je isključivo testom RBC-FluoGene CDE eXtend. U jednom uzorku ispitanika s hibridnim alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* delecija *RHD* dokazana je dodatno i testom za zigotnost lokusa *RHD*.

### 4.3. Varijante gena *RHD* i *RHCE* u ispitivanoj populaciji

#### 4.3.1. *RHD\*01EL.32* (*RHD\*DEL32*)

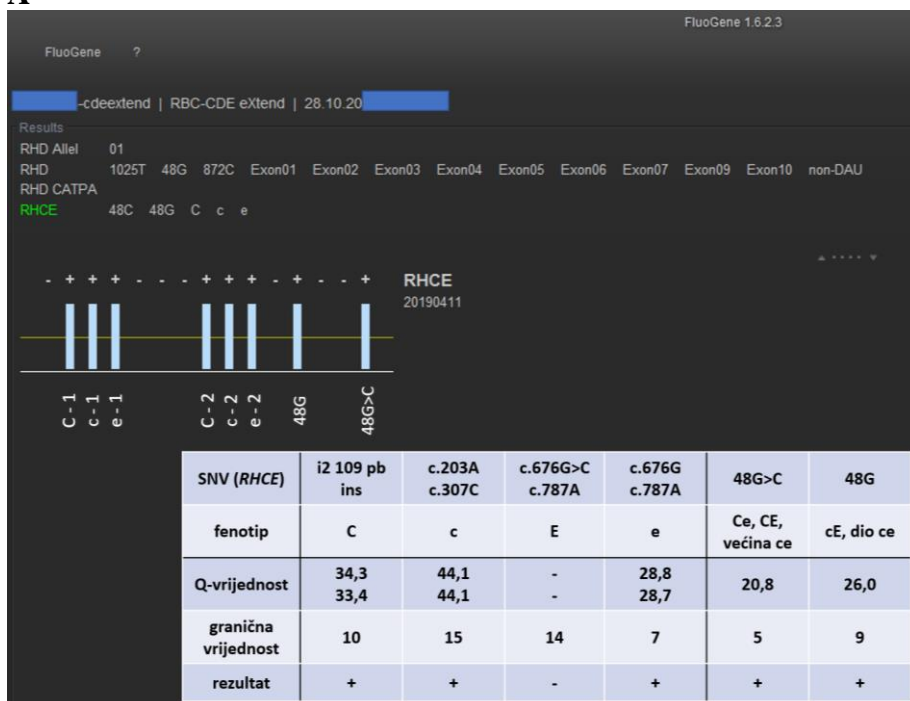
Testiranjem ispitanika s alelom *RHD\*DEL32* metodom qPCR dobiven je rezultat specifičnih polimorfizama u genu *RHD* koji odgovara rezultatu analize uzoraka s alelom *RHD\*01* (slike 17 i 18B).



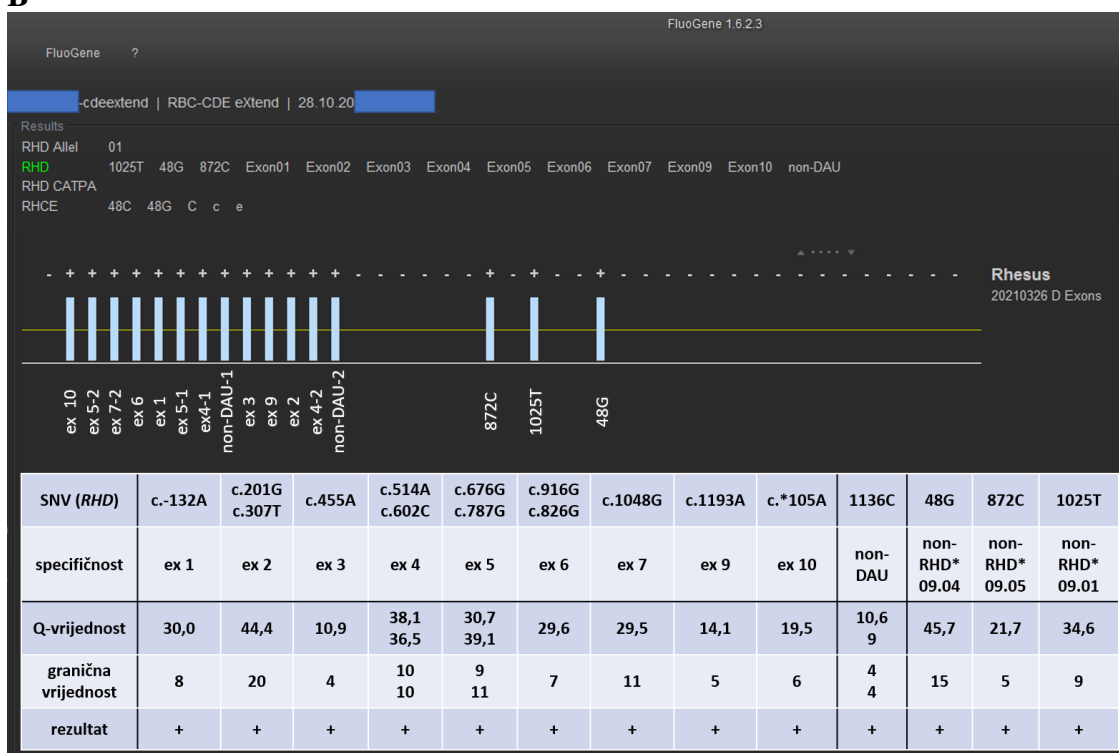
**Slika 17.** Shematski prikaz lokusa *RHD* s alelom *RHD\*DEL32*. Crveno su egzoni *RHD* (numerirani). Crna crta označava SNV c.149-29G>C u intronu 1 (uz egzon 2). Prilagođeno prema [76].

Za gene *RHCE* tog ispitanika potvrđena je serološka tipizacija dokazom polimorfizama za antigene C, c i e (Slika 18A). Na Slici 18 nalazi se programski prikaz rezultata testiranja metodom qPCR. U tablicama je za svaku probu naveden SNV koji ona detektira, Q-vrijednost dobivena testiranjem te odgovarajuća granična vrijednost i rezultat pojedine probe (+ za pozitivnu, - za negativnu). Ako u testu za polimorfizme postoje po dvije različite probe, one su numerirane sufiksima -1 i -2. U tablicama su navedene posebne vrijednosti za svaku od njih: gornja vrijednost za probu sa sufiksom -1, donja za probu sa sufiksom -2. Istovjetan opis Slike 18 može se primijeniti i na istovrsne slike koje prikazuju rezultate testiranja metodom qPCR alela opisanih u potpoglavljima 4.3.2 i 4.3.3.

A



B

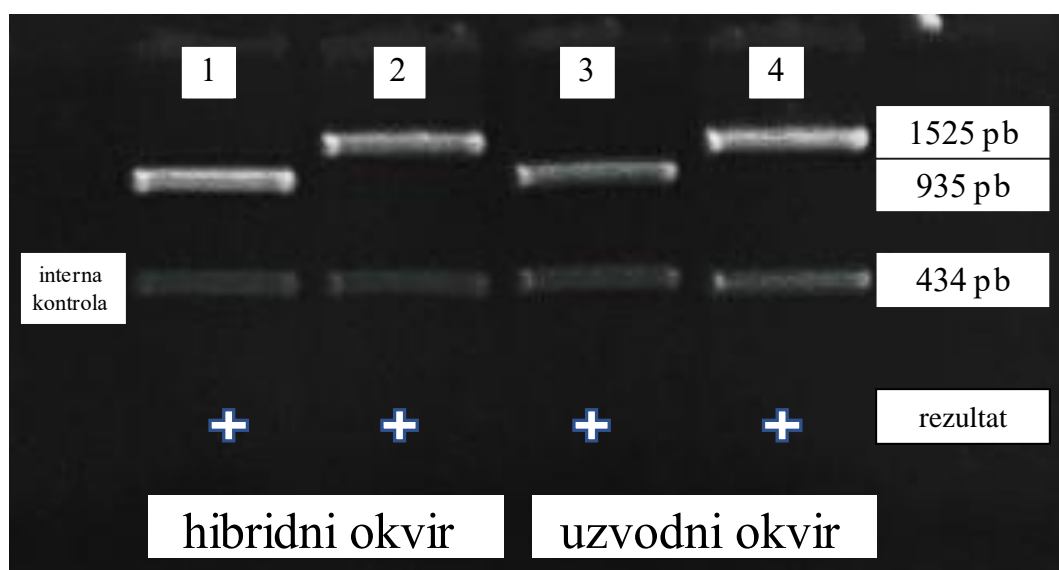


**Slika 18.** Rezultat tipizacije lokusa *RHCE* i *RHD* u uzorku ispitanika s alelom *RHD\*DEL32* metodom qPCR. Uz pozitivne probe označena je njihova specifičnost za egzone *RHD* odnosno polimorfizme za fenotip u *RHCE*, te pojedine polimorfizme u oba gena. Egzoni *RHD* su označeni s ex i numerirani. **(A)** – rezultat lokusa *RHCE*, **(B)** – rezultat lokusa *RHD*.



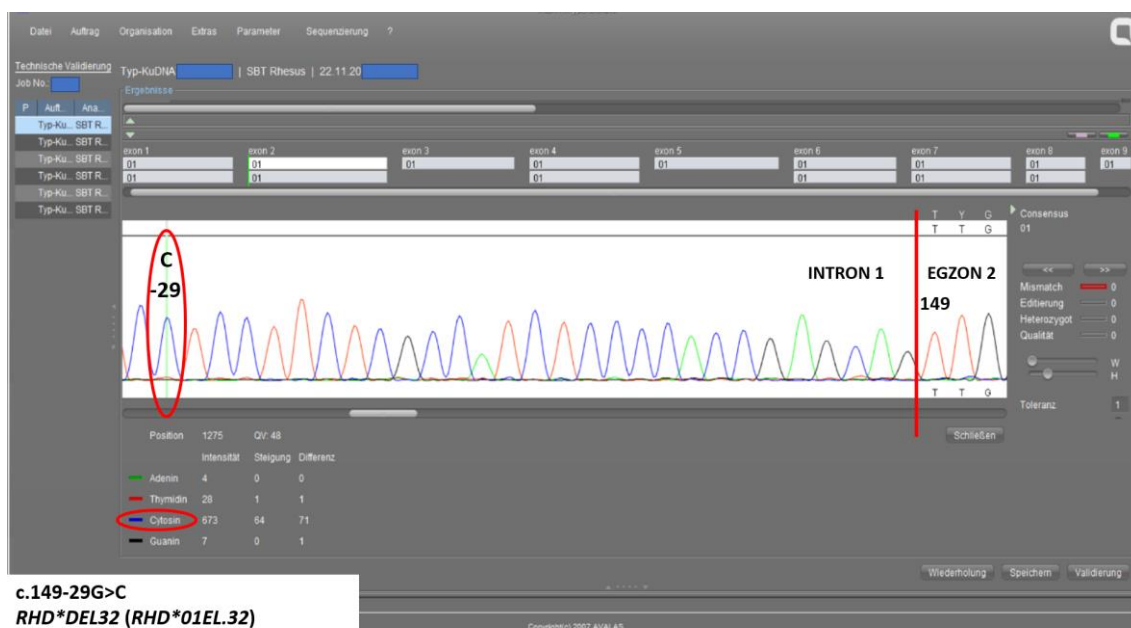
Ispitanik s alelom *RHD\*DEL32* jest hemizigot za lokus *RHD*, jer je na homolognom kromosomu 1 delecija gena *RHD*. Na Slici 19 nalazi se fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze uzorka ispitanika s alelom *RHD\*DEL32*. Kako su dobiveni svi ampliconi i za hibridni (linije 1 i 2) i za uzvodni Rh-okvir (linije 3 i 4), ispitanik s alelom *RHD\*DEL32* jest hemizigot. Na jednom kromosomu 1 došlo je do delecije gena *RHD* (*RHD\*01N.01*), što dokazuje hibridni okvir, dok je na homolognom kromosomu prisutan gen *RHD*, što dokazuje uzvodni okvir. Stoga je na lokusu *RHD* genotip ovog ispitanika *RHD\*DEL32 / RHD\*01N.01*.

Iz rezultata zigotnosti lokusa *RHD* i Rh-fenotipa ispitanika (DCcee), a na temelju podataka o učestalosti haplotipova, pretpostavljeni haplotip u kojemu se nalazi alel *RHD\*DEL32* određen je kao *DCe*. U skladu s tim, pretpostavljen je genotip ispitanika *DCe/dce*, ili *RHD\*01EL.32, RHCE\*02 / RHD\*01N.01, RHCE\*01*.

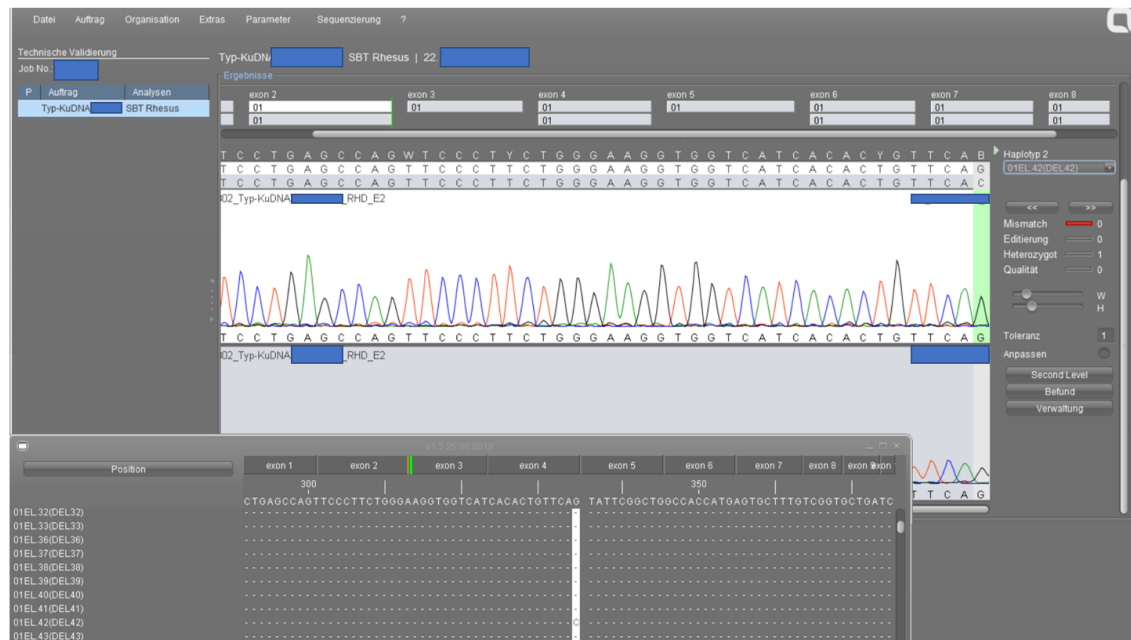


**Slika 19.** Rezultat analize zigotnosti lokusa *RHD* ispitanika s alelom *RHD\*DEL32* metodom PCR-SSP (test RBC-Ready Gene Zygofast). Specifične reakcije u linijama 1 i 2 označavaju reaktivnost za hibridni Rh-okvir, a u linijama 3 i 4 za uzvodni Rh-okvir. Interna kontrola, *HGH*, duljine amplicona 434 pb, pozitivna je u svim linijama.

Sekvenciranjem DNA otkriven je SNV u odnosu na *RHD\*01* u intronu 1, 29 pozicija u smjeru 5' od početnog nukleotida egzona 2 (Slika 20). Utvrđen je SNV oznake c.149-29G>C. U elektroferogramu ujedno je provjeren i nukleotid na poziciji c.335 kako bi se isključio alel *RHD\*DEL42* (Slika 21).



**Slika 20.** Elektroferogram dijela slijeda nukleotida na granici introna 1 i egzona 2 gena *RHD* u uzorku ispitanika s alelom *RHD\*DEL32*. Označen je nedvojbeno prisutan citozin na poziciji c.149-29. Ostatak sekvence svih egzona ovog alela jednak je sekvenci alela *RHD\*01*.



**Slika 21.** Elektroferogram dijela slijeda nukleotida s kraja egzona 2 i početka egzona 3 alela *RHD\*DEL32*. Budući da *RHD\*DEL42* ima dodatni SNV u odnosu na *RHD\*DEL32* na posljednjem nukleotidu u egzonu 2 (c.335G>C), dodatnom provjerom slijeda nukleotida potvrđeno je da taj SNV nije prisutan u genu *RHD* ispitanika.

Testom adsorpcije i elucije dokazana je prisutnost antigena D na eritrocitima ispitanika, jer su u eluatu identificirana protutijela anti-D prethodno adsorbirana na eritrocite. U skladu s tim, antigen D, kao produkt ekspresije alela *RHD\*DEL32*, u ovog je ispitanika DEL fenotipa (Slika 22).

Ortho Clinical Diagnostics  
© Ortho Clinical Diagnostics 2010

PATIENT NAME: G [REDACTED]  
PATIENT ID: [REDACTED]  
DATE: 3 [REDACTED] TECH: [REDACTED]  
CONCLUSION: [REDACTED]

Lot No. 8 [REDACTED] Exp. Date 20 [REDACTED]  
CCYY-MM-DD

**Panel C**  
REAGENT RED BLOOD CELLS  
0.8% RESOLVE PANEL C SYSTEM  
0.8% Resolve® Panel C **Flu** Treated  
0.8% Resolve® Panel C Untreated  
ANTIGRAM® Antigen Profile .

**anti-D**

Cell#	Rh-ir	Donor Number	Rh-ir													KELL													DUFFY						KIDD						Lewis						MNS						P						LUTHERAN						Special Antigen Typing	Cell#	Test Results
			D	C	E	c	e	f	Cw	V	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Jsa <sup>a</sup>	Jsb <sup>a</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	Xg <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	S	s	M	N	P <sub>1</sub>	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>																																				
1	R1wR1	500319	+	+	0	0	+	0	+	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+																																					
2	R1R1	502193	+	+	0	0	+	0	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+																																					
3	R2R2	502194	+	0	+	+	0	0	0	/	0	+	+	+	/	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+																																						
4	Ror	502195	+	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+																																						
5	rr	502196	0	+	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+																																						
6	r'r	502197	0	0	+	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+	0	+																																						
7	rr	502198	0	0	0	+	+	+	0	/	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+																																						
8	rr	502199	0	0	0	+	+	+	0	/	+	0	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+																																						
9	rr	502200	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+																																						
10	rr	500354	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+																																						
11	R1R1	502201	+	+	0	0	+	0	0	/	+	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+																																						
Patient Cells			37°C/Antiglobulin													Antiglobulin													Variable						Cold						Var.																										

Shaded columns indicate those antigens which are destroyed or depressed by enzyme treatment. \* represents "Not Tested" for new donors.

Eluat s antitijelima koji su se neutralizirali s blokom anti-D u roku 1 sat na 37°C.

**Slika 22.** Rezultat testa adsorpcije i elucije uzorka ispitanika s antigenom D DEL fenotipa, produktom alela *RHD\*DEL32*. Označene su specifične reakcije za protutijelo anti-D, kao i dobiveni rezultati.

#### 4.3.2. *RHD\*01EL.44 (RHD\*DEL44)*

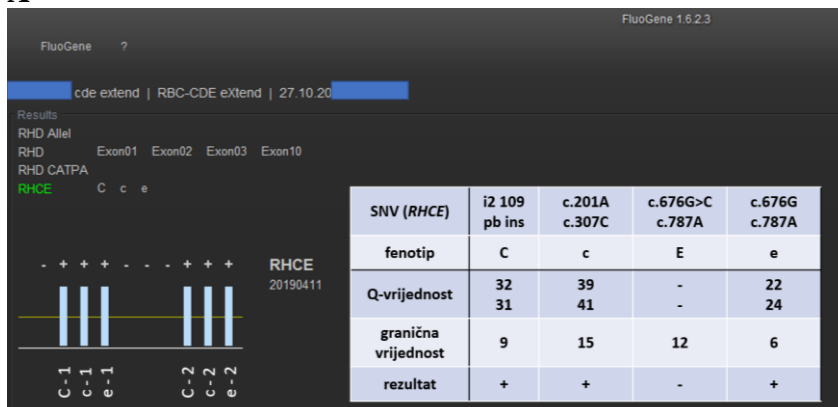
Alel *RHD\*DEL44* (Slika 23) bio je u potpunosti dokazan metodom qPCR (Slika 24).



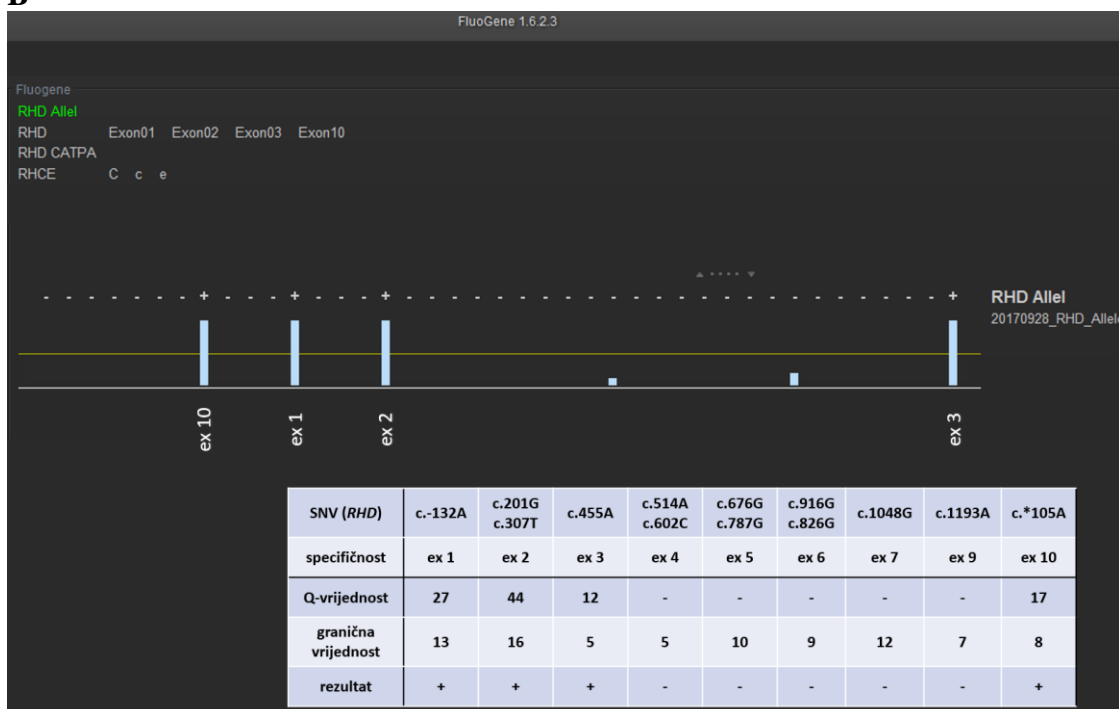
**Slika 23.** Shematski prikaz lokusa *RHD* s alelom *RHD\*DEL44*. Crveno su egzoni gena *RHD*, a plavo egzoni s umetnutnom sekvencom od gena *RHCE* (numerirani). Crne crte označavaju distribuciju SNV-ova u egzonima 4 do 9 koji razlikuju alel *RHD\*DEL44* od *RHD\*01*. Prilagođeno prema [76].

U ispitanika s ovim alelom dokazani su polimorfizmi karakteristični za egzone 1, 2, 3 i 10 gena *RHD* (Slika 24B), te za antigene C, c i e kodirane genom *RHCE* (Slika 24A). Takav molekularni mehanizam odražava se u hibridnoj strukturi alela koja se na temelju ovog rezultata može označiti s *RHD\*D-CE(4-9)-D*.

A



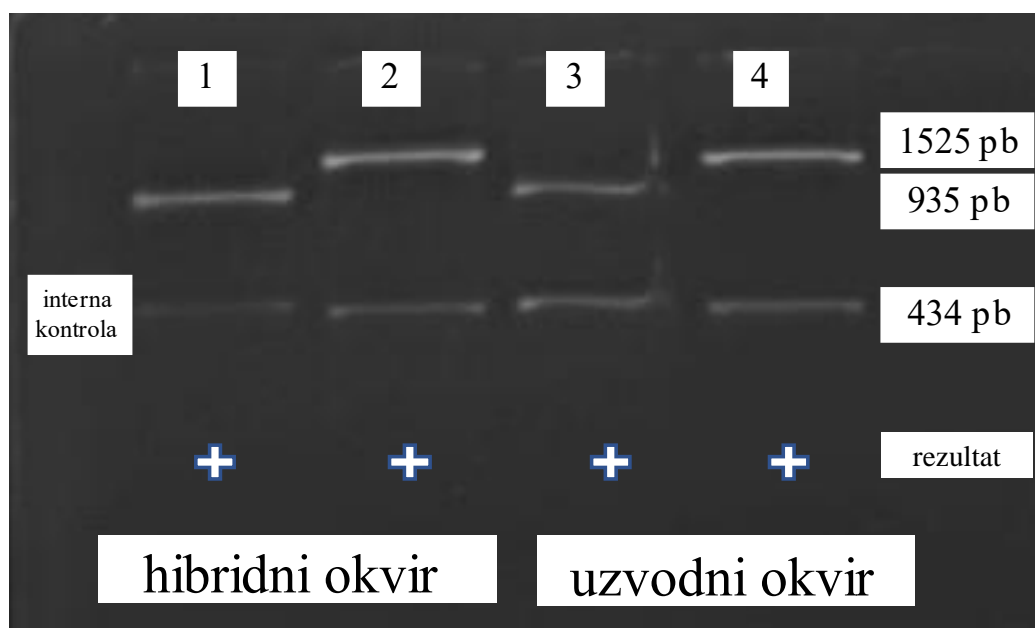
B



**Slika 24.** Rezultat tipizacije lokusa *RHCE* i *RHD* u uzorku ispitanika s alelom *RHD\*DEL44* metodom qPCR. Uz pozitivne probe označena je njihova specifičnost za egzone *RHD* odnosno polimorfizme za fenotip u *RHCE*. Egzoni *RHD* su označeni s ex i numerirani.

(A) – rezultat lokusa *RHCE*, (B) – rezultat lokusa *RHD*.

Ispitanik s alelom *RHD\*DEL44* jest hemizigot za lokus *RHD*, jer je na homolognom kromosomu 1 delecija gena *RHD*. Na Slici 25 nalazi se fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze uzorka ispitanika s alelom *RHD\*DEL44*. Kako su dobiveni svi amplikoni i za hibridni (linije 1 i 2) i za uzvodni Rh-okvir (linije 3 i 4), ispitanik s alelom *RHD\*DEL44* jest hemizigot. Na jednom kromosomu 1 došlo je do delecije gena *RHD* (*RHD\*01N.01*), što dokazuje hibridni okvir, dok je na homolognom kromosomu prisutan gen *RHD*, što dokazuje uzvodni okvir. Stoga je na lokusu *RHD* genotip ovog ispitanika *RHD\*DEL44* / *RHD\*01N.01*.

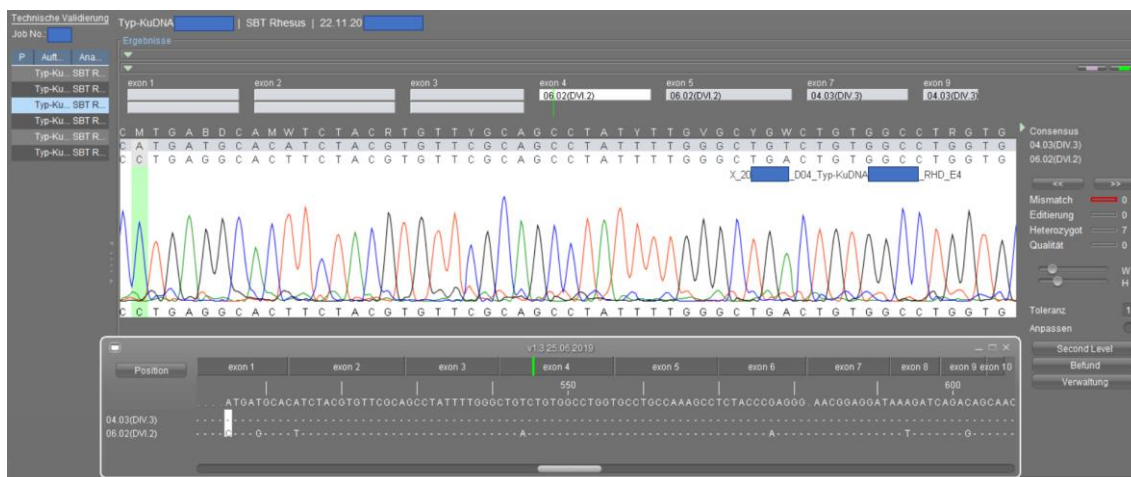


**Slika 25.** Rezultat analize zigtosti lokusa *RHD* ispitanika s alelom *RHD\*DEL44* metodom PCR-SSP (test RBC-Ready Gene Zygofast). Specifične reakcije u linijama 1 i 2 označavaju reaktivnost za hibridni Rh-okvir, a u linijama 3 i 4 za uzvodni Rh-okvir. Interna kontrola, *HGH*, duljine amplikona 434 pb, pozitivna je u svim linijama.

Iz rezultata zigtosti lokusa *RHD* i Rh-fenotipa ispitanika (DCcee), a na temelju podataka o učestalosti haplotipova, pretpostavljeni haplotip u kojemu se nalazi alel *RHD\*DEL44* određen je kao *DCe*. U skladu s tim, pretpostavljen je genotip ispitanika *DCe/dce*, ili *RHD\*01EL.44*, *RHCE\*02* / *RHD\*01N.01*, *RHCE\*01*.

Sekvenciranjem DNA ispitanika potvrđen je alel *RHD\*DEL44*, jer su samo sljedovi nukleotida egzona 1, 2, 3 i 10 jednaki s alelom *RHD\*01* (Slika 26). *RHD\*DEL44* nije bio naveden kao poseban alel u bazi alela programa HiType. Uvidom u odstupanja sekvenci prikazanih alela u egzonima 4, 5, 7 i 9 od *RHD\*01* (Tablica 14), utvrđeno je, da su to sekvence istovjetnih egzona alela *RHCE* koji kodiraju antigen e (aleli sa sekvencom c.676G u egzonu 5, *RHCE\*01* ili *RHCE\*02*) [11,13,60,76]. Program je točno prikazao da su sekvence egzona 4 i 5 iz ispitivanog uzorka jednake tim egzonima u alelu *RHD\*06.02*, a sekvence egzona 7 i 9 jednakim egzonima u alelu *RHD\*04.03*. Slika 26 prikazuje snimku zaslona elektroferograma prvih sedam polimorfizama iz egzona 4 u smjeru 5'→3' po kojima se razlikuju aleli *RHD\*01* i *RHD\*DEL44*.

Egzone 6 i 8 alela *RHD\*DEL44* nije bilo moguće sekvencirati jer su početnice za sekvenciranje bile specifične za egzone 6 i 8 gena *RHD*.



**Slika 26.** Elektroferogram dijela slijeda nukleotida s početka egzona 4 alela *RHD\*DEL44*. Sekvence egzona 1, 2, 3 i 10 u potpunosti odgovaraju sekvenci alela *RHD\*01*. Egzon 10 nije prikazan na slici zbog ograničenosti veličine snimke zaslona.

Ukupno je u egzonom alela *RHD\*DEL44* različitim od *RHD\*01* koji su bili sekvencirani (egzoni 4, 5, 7 i 9) promijenjen 31 nukleotid u odnosu na referentni alel *RHD\*01* (Tablica 14).

**Tablica 14.** Polimorfizmi određeni u sekvenci alela *RHD\*01EL.44* u odnosu na alel *RHD\*01* (*RHD\*01* > *RHD\*01EL.44*).

Egzon	Pozicija u genu <i>RHD</i>	Egzon	Pozicija u genu <i>RHD</i>
Egzon 4 <i>RHD*01EL.44</i>	c.505A>C	Egzon 7 <i>RHD*01EL.44</i>	c.941G>T
	c.509T>G		c.968C>A
	c.514A>T		c.974G>T
	c.544T>A		c.979A>G
	c.577G>A		c.985GG>CA
	c.594A>T		c.989A>C
	c.602C>G		c.992A>T
Egzon 5 <i>RHD*01EL.44</i>	c.667T>G		c.1025T>C
	c.697G>C		c.1048G>C
	c.712G>A		c.1053C>T
	c.733G>C	c.1057GGA>TGG	
	c.744C>T	c.1060GC>AA	
	c.787G>A	Egzon 9 <i>RHD*01EL.44</i>	c.1170T>C
	c.800A>T	c.1193A>T	

Egzon 6 nije mogao biti sekvenciran. Izvor: sekvenca DNA ispitanika s alelom *RHD\*01EL.44* u programu HiType.

Testom adsorpcije i elucije dokazana je prisutnost antigena D na eritrocitima ispitanika, jer su u eluatu identificirana protutijela anti-D prethodno adsorbirana na eritrocite. U skladu s tim, antigen D, kao produkt ekspresije alela *RHD\*DEL44*, u ovog je ispitanika DEL fenotipa (Slika 27).

Ortho Clinical Diagnostics  
© Ortho Clinical Diagnostics 2010

**anti-D**

PATIENT NAME: [REDACTED]  
PATIENT ID: [REDACTED]  
DATE: 3- [REDACTED] TECH: [REDACTED]  
CONCLUSION: [REDACTED]

Lot No. 8 [REDACTED] Exp. Date 20 [REDACTED]  
CCYY-MM-DD

**Panel C**  
REAGENT RED BLOOD CELLS  
0.8% RESOLVE PANEL C SYSTEM  
0.8% Resolve® Panel C Ficin Treated  
0.8% Resolve® Panel C Untreated  
ANTIGRAM® Antigen Profile

Cell#	Rh-ir	Donor Number	D	C	E	c	e	f	C <sup>w</sup>	V	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	S	s	M	N	P <sub>1</sub>	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Special Antigen Typing	Test Results	
1	R1wR1	500319	+	+	0	0	0	0	+	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+		H
2	R1R1	502193	+	+	0	0	0	0	0	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+		H	
3	R2R2	502194	+	0	+	+	0	0	0	/	0	+	+	+	/	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+		H		
4	Ror	502195	+	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+		H	
5	r'r	502196	0	+	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	@		
6	r'r	502197	0	0	+	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0	+	@		
7	rr	502198	0	0	0	+	+	+	0	/	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	@		
8	rr	502199	0	0	0	+	+	+	0	/	+	0	0	+	/	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+			
9	rr	502200	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	0	+				
10	rr	500354	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	0	+				
11	R1R1	502201	+	+	0	0	0	0	0	/	+	+	0	+	/	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+		H	
Patient Cells																																	
Mode of Reactivity			37°C/Antiglobulin								Antiglobulin								Variable				Cold		Var.								

Shaded columns indicate those antigens which are destroyed or depressed by enzyme treatment. \*r represents "Not Tested" for new donors.

elucija nakon adsorpcije eritrocita s anti-D Ortho reagensima (bockane)

**Slika 27.** Rezultat testa adsorpcije i elucije uzorka ispitanika s antigenom DEL fenotipa, produktom alela *RHD\*DEL44*. Označene su specifične reakcije za protutijelo anti-D, kao i dobiveni rezultati.

#### 4.3.3. Hibridni alel na lokusu *RHCE* u *RHD* negativnog ispitanika

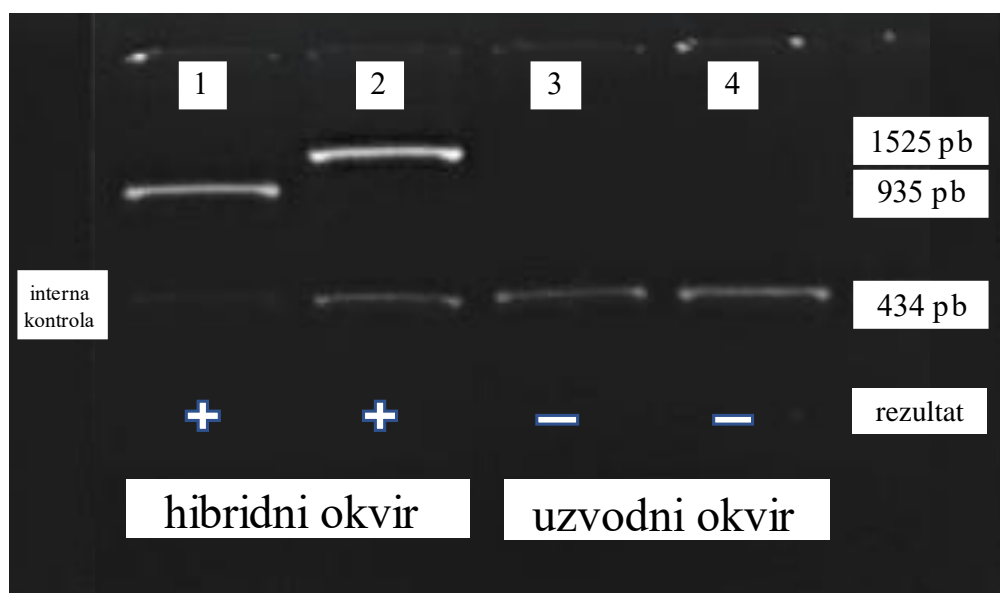
U jednog ispitanika utvrđen je hibridni alel na lokusu *RHCE* shematski prikazan na Slici 28, strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*, odnosno *RHCE\*D(1)-CE* [60,76]. Shematski prikaz izravan je rezultat testiranja metodom qPCR.



**Slika 28.** Shematski prikaz lokusa *RHCE* s hibridnim alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*, odnosno *RHCE\*D(1)-CE*. Egzon 1 gena *RHD* čija je specifična proba bila pozitivna u testu metodom qPCR označen je crveno, a plavo su numerirani egzoni gena *RHCE*. Prilagođeno prema [76].

Ispitanik s alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* jest homozigot za deleciju *RHD* jer je na oba homologna kromosoma 1 dokazan samo hibridni Rh-okvir. Od svih *RHD* negativnih ispitanika (702/704, Tablica 13), ovo je jedini ispitanik kojemu je izravno potvrđena homozigotna prisutnost sekvenci hibridnog Rh-okvira.

Na Slici 29 nalazi se fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze uzorka ispitanika. Kako su dobiveni amplikoni isključivo za hibridni Rh-okvir (linije 1 i 2), dok su linije za uzvodni Rh-okvir negativne (linije 3 i 4), ispitanik s alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* jest homozigot za deleciju gena *RHD* na oba kromosoma, odnosno, ispitanik nema nijedan lokus *RHD*. Stoga je na lokusu *RHD* genotip ovog uzorka *RHD\*01N.01 / RHD\*01N.01*.

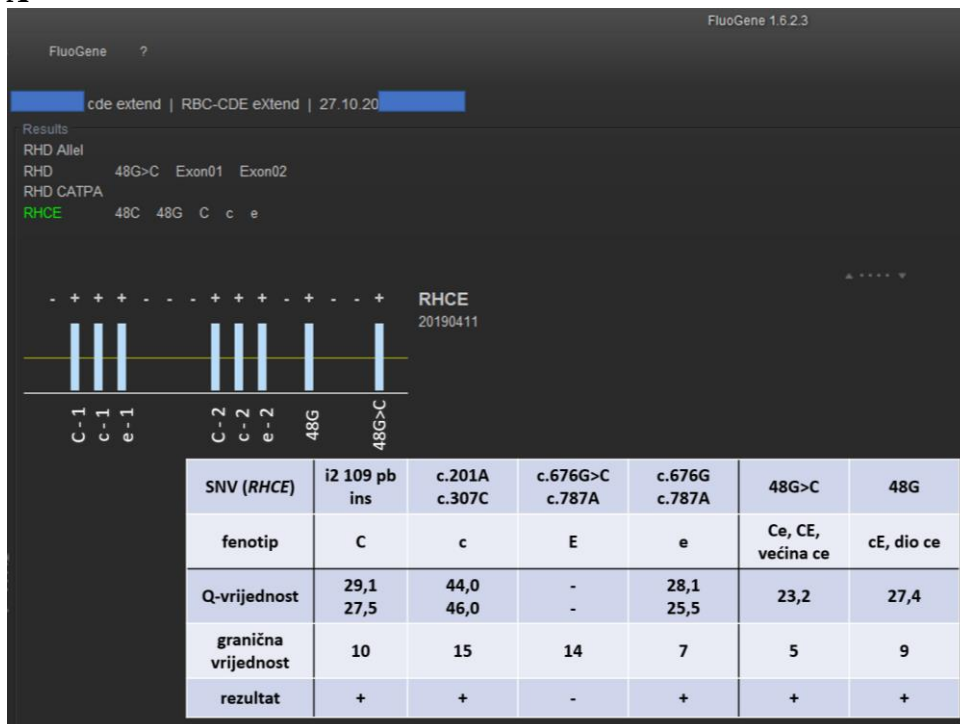


**Slika 29.** Rezultat analize zigotnosti lokusa *RHD* ispitanika s alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* metodom PCR-SSP (testom RBC-Ready Gene Zygofast). Specifične reakcije u linijama 1 i 2 označavaju reaktivnost za hibridni Rh-okvir (pozitivne), a u linijama 3 i 4 za uzvodni Rh-okvir (negativne). Interna kontrola, HGH, duljine amplikona 434 pb, pozitivna je u svim linijama, s nešto slabijom reakcijom u liniji 1.

Na Slici 30 nalazi se programski prikaz rezultata testiranja hibridnog alela strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* metodom qPCR kojom je njegova struktura dokazana u potpunosti.



A



B



**Slika 30.** Rezultat tipizacije lokusa *RHCE* i *RHD* u uzorku ispitanika s alelom strukture *RHCE*\*D-CE(2-10) metodom qPCR. Uz pozitivne probe označena je njihova specifičnost za egzone *RHD* odnosno polimorfizme za fenotip u *RHCE*, te pojedine polimorfizme u oba gena. Egzoni *RHD* su označeni s ex i numerirani.

(A) – rezultat lokusa *RHCE*, (B) – rezultat lokusa *RHD*.

Uzorak ispitanika pokazivao je ponavljajuću pozitivnu reakciju u metodi qPCR za polimorfizam kojim se u testu potvrđuje egzon 1 *RHD* (c.-132A), relativno niske Q-vrijednosti (blizu granične vrijednosti), no uvijek jasno prisutnu. Pozitivna je bila i reakcija za karakterističan SNV egzona 2 *RHD* (c.201G, c.307T), inače uvijek pozitivna u osoba s ekspresijom antigena C, pa i u *RHD* negativnih osoba, zbog istih polimorfizama u genu *RHD* i alelima *RHCE\*02* (\*Ce) i *RHCE\*04* (\*CE). Nijedna druga specifična reakcija za egzone *RHD* nije bila pozitivna. Ponovljivo i stalno bile su pozitivne probe za SNV u genu *RHD* c.48G>C, koji je među alelima *RHD* najviše karakterističan za alel *RHD\*09.04* (Tablica 5) te alel *RHD\*01.01* [11]. U Tablici 15 popisani su svi polimorfizmi definirani u ispitanika s hibridnim alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* metodom qPCR (Slika 30). Polimorfno mjesto u intronu 1 gena *RHCE* nije eksplicitno utvrđeno, ali je posredno potvrđeno kao pozitivno u ovom uzorku. To je specifično mjesto vezanja početnice na 3'-kraju amplicona karakterističnog za gen *RHCE*, na koji se vežu probe *RHCE* c.48G>C i *RHCE* c.48G na temelju pozitivnih polimorfizama c.48G>C i c.48G u genu *RHCE*. Probe za *RHD* c.48G>C i *RHD* c.48G vežu se na amplicon čija je restrikcija za gen *RHD* specifična sekvenca u 5'UTR, c.-132A (Prilog 2). Ta je sekvenca različita u genu *RHCE* (c.-132G) i u ovom istraživanju nije mogla biti eksplicitno testirana metodom qPCR [14].

**Tablica 15.** Polimorfizmi karakteristični za sekvence gena *RHD* i *RHCE* u ispitanika s delecijom gena *RHD* i hibridnim alelom na lokusu *RHCE* definirani metodom qPCR.

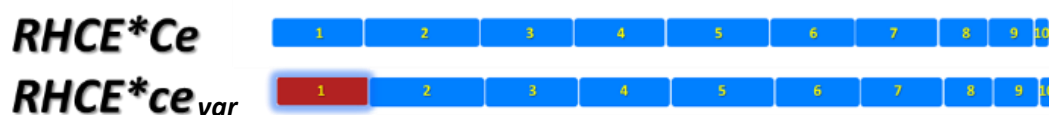
Polimorfno mjesto u DNA	5'UTR	Egzon 1	Egzon 1	Intron 1 <i>RHCE</i>	Egzon 2	Egzon 2	Intron 2	Egzon 3	Egzon 5	Egzon 5
	c.-132	c.48C	c.48G	NS	c.201	c.307	ins 109 bp intron 2	c.455	c.676	c.787
Polimorfizmi <i>RHCE</i>	NT	C	G	+	A G	C T	+	NT	G	A
Polimorfizmi <i>RHD</i>	A	C	–	NP	G	T	NP	–	–	–

Znak + označava pozitivnu, znak – negativnu reakciju. NS = nije specificirano, NP = nije primjenjivo, NT = nije testirano. Slova označavaju nukleotid određen na polimorfnom mjestu specifičnom probom u metodi qPCR. Polimorfizmi su karakteristični za sekvence lokusa *RHCE* i *RHD*.

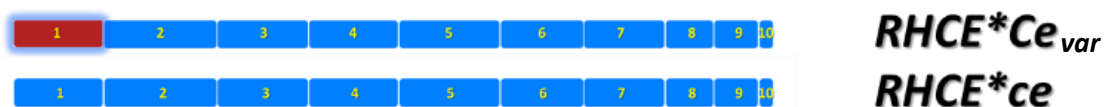
Na temelju rezultata dobivenih metodom qPCR za polimorfizme antigena C, c, E i e molekularno je potvrđen prethodno serološki određen Rh-fenotip dCcee. Haplotip s hibridnim alelom strukture  $RHCE^*D-CE(2-10)$  nije mogao biti direktno i eksplicitno eksperimentalno potvrđen. Tako je određen mogući haplotip s hibridnim alelom  $d(ce)_{var}$  ili  $d(Ce)_{var}$ . Pritom indeks *var* označava alel strukture  $RHCE^*D-CE(2-10)$ , ovisno o tome je li odsječkom gena *RHD* modificiran dio gena *RHCE* koji u preostalom dijelu nosi polimorfizme za ekspresiju antigena slijedom c ili C. Na temelju rezultata testiranja utvrđen je genotip ispitanika kao jedna od dviju sljedećih mogućnosti (Slika 31):

- 1 –  $dCe/d(ce)_{var}$  ili  $RHD^*01N.01, RHCE^*02 / RHD^*01N.01, RHCE^*D-CE(2-10)$ ;
- 2 –  $d(Ce)_{var}/dce$  ili  $RHD^*01N.01, RHCE^*D-CE(2-10) / RHD^*01N.01, RHCE^*01$ .

#### opcija 1



#### opcija 2



**Slika 31.** Potencijalni genotipovi hibridnog alela strukture  $RHCE^*D-CE(2-10)$ , označenim indeksom *var*, s drugim nepromijenjenim alelom *RHCE* u ispitanika. Plavo su sekvence koje potječu iz gena *RHCE*, a crveno iz gena *RHD*. U opciji 1 hibridni alel kodira antigene c i e, u opciji 2 antigene C i e.

Sekvenciranje DNA alela strukture  $RHCE^*D-CE(2-10)$  nije bilo moguće provesti početnicama za sekvenciranje egzona *RHD*. Na fotografiji gela nakon početne PCR reakcije nisu utvrđeni specifični amplikoni ni u jednoj jažici. Amplificirana je samo interna kontrola, *HGH*, te su na dnu fotografije uočene vrpce koje predstavljaju dimere početnica (engl. *primer dimer*). Kako nije amplificirana DNA ispitanika, nije bilo moguće nastaviti ni PCR-om za sekvenciranje niti kapilarnom elektroforezom.

Testom adsorpcije i elucije dokazana je prisutnost epitopa RhD na eritrocitima ispitanika jer su u eluatu identificirana protutijela anti-D prethodno adsorbirana na eritrocite. U skladu s tim, produkt hibridnog alela strukture  $RHCE^*D-CE(2-10)$  pokazuje ekspresiju epitopa RhD, iako ispitanik uopće nema nijedan lokus *RHD* (Slika 32).

Ortho Clinical Diagnostics  
©Ortho Clinical Diagnostics 2010

anti-D

PATIENT NAME: 6. [redacted]  
PATIENT ID: [redacted]  
DATE: 3. [redacted] TECH: [redacted]  
CONCLUSION:

Panel C  
REAGENT RED BLOOD CELLS  
0.8% RESOLVE PANEL C SYSTEM  
0.8% Resolve® Panel C Ficin Treated  
0.8% Resolve® Panel C Untreated  
ANTIGRAM® Antigen Profile

Cell#	Rh-ir	Donor Number	D	C	E	c	e	f	Cw	V	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Jsb	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jka	Jkb	Xga	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	S	s	M	N	P <sub>1</sub>	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Special Antigen Typing	Test Results	
1	R1wR1	500319	+	+	0	0	+	0	+	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+		1	2+
2	R1R1	502193	+	+	0	0	+	0	0	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+		2	2+
3	R2R2	502194	+	+	+	+	0	0	0	/	0	+	+	+	/	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+		3	2+	
4	Ror	502195	+	+	0	0	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+		4	2+
5	r'r	502196	0	+	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	@	5	0	
6	r'r	502197	0	0	+	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	@	6	0	
7	rr	502198	0	0	0	+	+	+	0	/	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	@	7	0		
8	rr	502199	0	0	0	+	+	+	0	/	+	0	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+		8	0	
9	rr	502200	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	0	+		9	0	
10	rr	500354	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+		10	0	
11	R1R1	502201	+	+	0	0	+	0	0	/	+	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+		11	2+	

Shaded columns indicate those antigens which are destroyed or depressed by enzyme treatment. \*r represents "Not Tested" for new donors.

eluciat s eritrociti koji su se inkubirali s Anti-D. Ortho reagentom 1 sat na 37°C.

Slika 32. Rezultat testa adsorpcije i elucije uzorka RHD negativnog ispitanika s produktom hibridnog alela strukture RHCE\*D-CE(2-10). Označene su specifične reakcije za protutijelo anti-D, kao i dobiveni rezultati.

Testom adsorpcije i elucije kao negativna kontrola testirani su i eritrociti jednakog Rh-fenotipa (dCcee) koji je bio određen serološki i u uzorku s hibridnim alelom RHCE. U kontrolnom uzorku nije dokazana prisutnost epitopa RhD, jer u eluatu nisu identificirana protutijela anti-D prethodno adsorbirana na kontrolne eritrocite (Slika 33).

Ortho Clinical Diagnostics  
©Ortho Clinical Diagnostics 2010

nije dokazan anti-D

PATIENT NAME: NEGATIVNA KONTROLA  
PATIENT ID: [redacted]  
DATE: 08. [redacted] TECH: [redacted]  
CONCLUSION:

Panel C  
REAGENT RED BLOOD CELLS  
0.8% RESOLVE PANEL C SYSTEM  
0.8% Resolve® Panel C Ficin Treated  
0.8% Resolve® Panel C Untreated  
ANTIGRAM® Antigen Profile

Cell#	Rh-ir	Donor Number	D	C	E	c	e	f	Cw	V	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Jsb	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jka	Jkb	Xga	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	S	s	M	N	P <sub>1</sub>	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Special Antigen Typing	Test Results	
1	R1wR1	500319	+	+	0	0	+	0	+	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+		1	0	
2	R1R1	502193	+	+	0	0	+	0	0	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+		2	0
3	R2R2	502194	+	+	+	+	0	0	0	/	0	+	+	+	/	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+		3	0	
4	Ror	502195	+	+	0	0	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+		4	0
5	r'r	502196	0	+	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	@	5	0	
6	r'r	502197	0	0	+	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	@	6	0	
7	rr	502198	0	0	0	+	+	+	0	/	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	@	7	0		
8	rr	502199	0	0	0	+	+	+	0	/	+	0	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+		8	0	
9	rr	502200	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	0	+		9	0	
10	rr	500354	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+		10	0	
11	R1R1	502201	+	+	0	0	+	0	0	/	+	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+		11	0	

Shaded columns indicate those antigens which are destroyed or depressed by enzyme treatment. \*r represents "Not Tested" for new donors.

ELUAT S RHO NEG I C DIZI POC (C doleat)

Slika 33. Rezultat testa adsorpcije i elucije eritrocita fenotipa dCcee kao negativne kontrole. Označene su specifične reakcije za protutijelo anti-D, kao i dobiveni rezultati.

#### 4.4. Haplotipovi u ispitivanoj populaciji

Haplotipovi gena *RHD* i *RHCE* utvrđeni su izravnim brojenjem, kombinacijom seroloških i rezultata testiranja alela *RHD* i *RHCE* metodom qPCR. Raspodjela haplotipova utvrđena u ovom istraživanju prikazana je u Tablici 16. Od ukupno 1408 haplotipova najviše je bilo haplotipa *dce* (1290, učestalost haplotipa 91,62 %). Prisutan je u 701 ispitanika (99,57 % ispitanika), od kojih se u 589 ispitanika nalazi na oba kromosoma 1 (homozigoti), a u 112 ispitanika genotip uz njega čini i neki drugi haplotip na homolognom kromosomu 1 (heterozigoti). Za dva uzorka fenotipa dCcEe (0,28 % ispitanika) određen je na temelju učestalosti haplotipova pretpostavljeni genotip dCe/dcE, a ne dCE/dce. Na taj način definirana su dva od 89 haplotipova *dCe* (2,25 %) i dva od 27 haplotipova *dcE* (7,41 %).

**Tablica 16.** Raspodjela haplotipova *RHD-RHCE* u RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske.

Haplotip		Broj haplotipova (učestalost, %)	Broj ispitanika s haplotipom, (učestalost, %)
Alternativna nomenklatura	Nomenklatura ISBT		
<i>RHD</i> negativni			
<i>dce</i> <sup>a</sup>	<i>RHD*01N.01, RHCE*01</i>	1290 (91,62)	701 (99,57)
<i>dCe</i> <sup>a</sup>	<i>RHD*01N.01, RHCE*02</i>	89 (6,32)	88 (12,50)
<i>dcE</i>	<i>RHD*01N.01, RHCE*03</i>	27 (1,92)	27 (3,84)
<i>dCE</i>	<i>RHD*01N.01, RHCE*04</i>	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>RHD</i> pozitivni			
<i>Dce</i>	Alel <i>RHD</i> osim nul-alela ( <i>RHD*01N.01</i> ), <i>RHCE*01</i>	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>DCe</i> <sup>b</sup>	Alel <i>RHD</i> osim nul-alela ( <i>RHD*01N.01</i> ), <i>RHCE*02</i> u ovom istraživanju: <i>RHD*01EL.44, RHCE*02</i> <i>RHD*01EL.32, RHCE*02</i>	2 (0,14)	2 (0,28)
<i>DcE</i>	Alel <i>RHD</i> osim nul-alela ( <i>RHD*01N.01</i> ), <i>RHCE*03</i>	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>DCE</i>	Alel <i>RHD</i> osim nul-alela ( <i>RHD*01N.01</i> ), <i>RHCE*04</i>	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>Ukupno</b>		1408 (100,00)	704 (100,00)

**a** Pod haplotipove *dce* i *dCe* u ovoj tablici uračunati su haplotipovi ispitanika s hibridnim alelom na lokusu *RHCE* strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*, prema rezultatima testiranja metodom qPCR.

**b** U ovu kategoriju uključena su oba ispitanika s otkrivenim alelima *RHD* (zbog toga označena podebljano) čiji su pretpostavljeni haplotipovi utvrđeni na temelju učestalosti haplotipova.

#### 4.5. Genotipovi u ispitivanoj populaciji

Genotipove u sustavu Rh bilo je moguće potvrditi izravnim brojenjem, kombinacijom seroloških i rezultata testiranja alela *RHD* i *RHCE* metodom qPCR za 699 od 704 ispitanika (99,29 %). Za fenotipove tih ispitanika postoji bijektivan odnos s genotipom koji kodira svaki od tih fenotipova – radi se o Rh-fenotipovima *dcee*, *dCcee*, *dccEe* i *dCCee*.

Za preostalih pet ispitanika (0,71 %) utvrđen je sljedeći genotip:

- a) U jednom uzorku ispitanika Rh-fenotipa *dCcee* (0,14 %) na lokusu *RHCE* utvrđen je hibridni alel *RHCE\*D-CE(2-10)*. Na temelju serološkog rezultata i testiranja metodom qPCR lokusa *RHCE* tom ispitaniku utvrđen genotip *dCe/dce*.
- b) Za po dva ispitanika s Rh-fenotipovima *dCcEe* i *DCcee* (po 0,28 %), pretpostavljeni genotipovi utvrđeni su na temelju učestalosti haplotipova:
  - za Rh-fenotip *dCcEe* – genotip *dCe/dcE*,
  - za Rh-fenotip *DCcee* – genotip *DCe/dce*.

Prema učestalosti haplotipova u populaciji Rh-fenotip *DCcee* u ispitanika u ovom istraživanju smatra se rezultatom genotipa *DCe/dce*, a ne iznimno rijetkog genotipa *Dce/dCe*. U ispitivanoj populaciji dva su takva uzorka, oba s alelima *RHD* (*RHD\*DEL32* i *RHD\*DEL44*).

Raspodjela svih genotipova utvrđenih u ovom istraživanju prikazana je u Tablici 17. U istraživanju je najveća učestalost genotipa *dce/dce* (u 589 od 704 ispitanika, 83,66 %).

**Tablica 17.** Raspodjela genotipova sustava Rh u ispitivanoj populaciji.

Rh-fenotip	Genotip	Broj ispitanika, N	Učestalost genotipa, %
<i>dcee</i>	<i>dce/dce</i>	589	83,66
<i>dCcee</i> <sup>a</sup>	<i>dCe/dce</i>	85	12,07
<i>dccEe</i>	<i>dcE/dce</i>	25	3,55
<i>dCCee</i>	<i>dCe/dCe</i>	1	0,14
<i>dCcEe</i>	<i>dCe/dcE</i>	2	0,28
<i>DCcee</i>	<i>DCe/dce</i>	2	0,28
Ostali fenotipovi	Ostali genotipovi	0	0,00
<b>Ukupno</b>		704	100,00

<sup>a</sup> Prema rezultatima serološkog i testiranja metodom qPCR lokusa *RHCE*, genotip ispitanika s hibridnim alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* uključen je u ovu kategoriju.

## 4.6. Usporedba učestalosti alela *RHCE* i *RHD* s drugim populacijama

### 4.6.1. Usporedba učestalosti alela *RHCE*

Tablica 18 prikazuje usporedbu učestalosti alela *RHCE* u ispitivanoj populaciji s odabranim populacijama te procjenama učestalosti u populacijama europskog, afričkog i azijskog porijekla [173]. Nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivane populacije i prikazanih europskih populacija, Brazila (kao predstavnika južnoameričke populacije) te populacija europskog i afričkog porijekla ( $P > 0,05$ ). Učestalost alela *RHCE* u ispitivanoj populaciji statistički se značajno razlikuje od procjene učestalosti alela *RHCE* u populacijama azijskog porijekla ( $P < 0,05$ ).

**Tablica 18.** Usporedba učestalosti alela *RHCE* u odabranim populacijama s populacijom RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske.

Populacija	Hrvatska (sjeverozapad)	Populacije			Njemačka (Baden- Württemberg)	Slovenija	Austrija (Tirol)	Brazil
		europskog porijekla	afričkog porijekla	azijskog porijekla				
<i>Učestalost RHCE*01, %</i>	91,62	95	90	51	95,96	94,83	95,06	96,19
<i>Učestalost RHCE*02, %</i>	6,46	3	5	0	2,68	4,60	3,39	3,49
<i>Učestalost RHCE*03, %</i>	1,92	2	5	41	1,36	0,57	1,55	0,32
<i>Učestalost RHCE*04, %</i>	0,00	0	0	8	< 0,01	0	0	0
Usporedba s ovim istraživanjem	$\chi^2$	1,048	1,399	56,143	1,418	0,782	1,049	1,462
	Stupnjevi slobode	3	3	3	3	3	3	3
	P	0,7896	0,7059	< 0,00001	0,7012	0,8538	0,7895	0,6911
Literatura	Ovo istraživanje Tablica 12	[173]	[173]	[173]	[174]	[87]	[87]	[175]

#### 4.6.2. Usporedba učestalosti alela *RHD*

Usporedba učestalosti ispitanika s alelom *RHD* u ispitivanoj populaciji i odabranim populacijama iz Europe, Južne Amerike i Azije prikazana je u Tablici 19.

Između ispitivane populacije i odabranih europskih populacija nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ). Međutim, postoji statistički značajna razlika u usporedbi s odabranim neeuropskim populacijama ( $P < 0,05$ ).

**Tablica 19.** Usporedba učestalosti alela *RHD* u odabranim populacijama s populacijom RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske.

Populacija	Hrvatska (sjeverozapad)	Njemačka (Baden- Württemberg 2001.	Njemačka (Baden- Württemberg 2009.	Austrija (Gornja Austrija)	Švicarska	Poljska	Brazil	Kina
Učestalost ispitanika s alelom <i>RHD</i> , %	0,284	0,592	0,208	0,403	0,473	0,202	7,199	23,3
Broj ispitanika s alelom <i>RHD</i>	2	50	96	94	120	63	101	1505
Ukupno serološki RhD negativnih davatelja	704	8442	46133	23330	25370	31200	1403	6470
Usporedba s ovim istraživanjem	$\chi^2$	1,092	0,192	0,243	0,525	0,228	48,187	202,14
	Stupnjevi slobode	1	1	1	1	1	1	1
	P	0,2961	0,6613	0,6219	0,4686	0,6333	< 0,0001	< 0,0001
Literatura	Ovo istraživanje Tablica 13	[46] <sup>a</sup>	[89]	[176]	[150]	[177]	[175]	[178] <sup>b</sup>

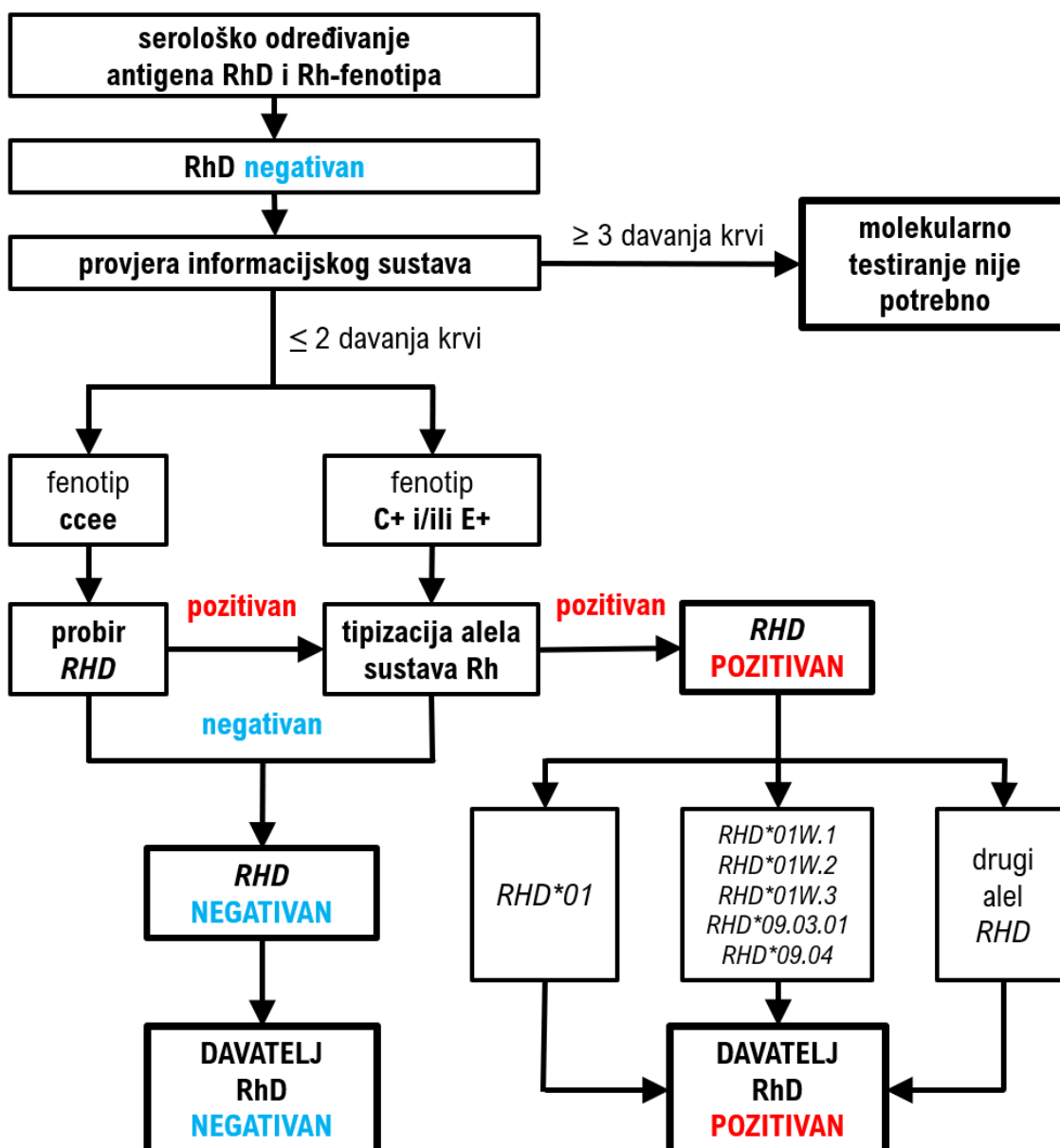
**a** Prvo istraživanje alela *RHD* u serološki RhD negativnih davatelja krvi u jednoj europskoj populaciji.

**b** Istraživanje je meta-analiza objavljenih literaturnih podataka iz Kine. Uključuje DEL fenotipove u serološki RhD negativnim davateljima krvi.



#### 4.7. Algoritam molekularnog određivanja alela sustava Rh u davatelja krvi

Algoritam molekularnog testiranja za rutinsko određivanje alela sustava Rh u davatelja krvi koji se predlaže temelji se na planu ovog istraživanja i posebno njegovim rezultatima. Prikazan je na Slici 34.



Slika 34. Algoritam molekularnog određivanja alela sustava Rh u davatelja krvi.

Prvi je korak napraviti rutinsko serološko testiranje antigena RhD prema nacionalnim preporukama za imunohematološko testiranje [144] te serološki odrediti Rh-fenotip, zbog dokumentirano pokazane veće učestalosti varijanti gena *RHD* u davatelja krvi s antigenima C i/ili E [87,96]. Ta testiranja se već rutinski provode, te informacija o njima postoji u nacionalnom informacijskom sustavu za transfuzijsku medicinu.

Svim serološki RhD negativnim davateljima krvi s fenotipom ccee potrebno je napraviti probir metodom qPCR s tri karakteristična egzona *RHD* (3, 5 i 10). Davatelj krvi koji je negativan u probirnom testu smatra se *RHD* negativnim. Uzorci davatelja krvi fenotipa C+ i/ili E+ testiraju se direktno testom za određivanje proširene tipizacije gena sustava Rh, kao i pozitivni uzorci u probirnom testu. Testom za proširenu tipizaciju molekularnom metodom u jednoj se seriji testiranja mogu dokazati najčešći aleli fenotipa slabog D, parcijalnog D i DEL fenotipa, kao i potvrditi polimorfizmi u genu *RHCE* odgovorni za ekspresiju antigena C, c, E i e. Davatelj je RhD pozitivan ili RhD negativan ovisno o dobivenom rezultatu te literaturnim navodima o mogućim fenotipovima eventualno pronađene varijante gena sustava Rh.

Primjeni li se uobičajeno pravilo za serološka testiranja, i pri molekularnom testiranju bilo bi važno ponoviti testiranje u drugog davanja krvi istog davatelja kako bi se smanjila mogućnost administrativnih pogrešaka. Nakon toga podatak o rezultatu molekularnog testiranja ostaje pohranjen u informacijskom sustavu pa molekularnu dijagnostiku nije potrebno ponavljati pri sljedećim davanjima krvi tih osoba.

## 5. RASPRAVA

Osnovna hipoteza ovog istraživanja bila je da će se u populaciji serološki RhD negativnih davatelja krvi molekularnim metodama moći utvrditi prisutnost određenih varijanti gena *RHD*. Ta je hipoteza ovim istraživanjem potvrđena. Stoga se na početku rasprave čini potrebnim postaviti opći kontekst svrhe ovog istraživanja, zašto se uopće pojavila potreba za uvođenjem molekularnih metoda u imunohematološko testiranje i određivanje alela za antigene eritrocitnih (i trombocitnih) antigena.

Transfuzija krvi je postupak kojim se u krvožilni sustav primatelja unosi tkivo davatelja s većinom nedefiniranim antigenima na krvnim stanicama. Imunosni sustav primatelja prepoznaje strane antigene koji se razlikuju od vlastitih i ako stvori specifična protutijela može doći do aloimunizacije [179,180]. Do danas je opisano 378 eritrocitnih (RBC) antigena [3,4], 35 sustava trombocitnih antigena (HPA) [181] i nešto manje od 33 000 alela HLA koji kodiraju antigene sustava HLA [16]. Protutijela usmjerena na te antigene mogu imati različitu kliničku važnost i uzrokovati akutne i odgođene hemolitičke reakcije, HBFN ili uzrokovati neefikasne transfuzije trombocita pri imunizacijama na trombocitne antigene [182,183].

U transfuzijskom liječenju potrebno je primijeniti podudarne doze krvi. Prijetransfuzijsko testiranje uključuje određivanje antigena krvnih grupa, probirne testove na antieritrocitna protutijela i križnu reakciju između seruma pacijenta i eritrocita davatelja, sve s ciljem sprečavanja hemolitičke reakcije u primatelja [174,175]. Općenito se prijetransfuzijsko testiranje temelji na podudarnosti u antigenima sustava ABO i RhD, kako bi se spriječila akutna hemolitička transfuzijska reakcija i aloimunizacija na antigen D. Osnovna je pretpostavka tih protokola, da se pacijentima daje krvni pripravak dobiven iz krvi davatelja podudaran samo u antigenima sustava ABO i antigenu D, što je i temelj zakonske odredbe za testiranje davatelja krvi u Hrvatskoj [152,153].

Prevenција aloimunizacije na druge antigene krvnih grupa provodi se prvenstveno u primateljima s antieritrocitnim protutijelima i u specifičnim skupinama kronično transfundiranih bolesnika [184,186-188]. Određivanje specifičnosti protutijela (identifikacija) i odabir podudarnog davatelja često može biti složeno i zahtijeva kompleksno laboratorijsko testiranje koje može napraviti samo visoko kvalificirano

osoblje [189]. Tipizacija više antigena krvnih grupa (proširena tipizacija, tipizacija proširenog fenotipa) serološkim metodama, za pacijente sklone aloimunizaciji, one koji su nedavno bili transfundirani ili za potvrdu genotipa u osoba s prisutnim protutijelima, dugotrajna je, skupa i ovisi o dostupnosti reagenasa za potvrdu tih antigena. Zato se taj postupak najčešće provodi u referentnim laboratorijima, što komplicira i produljuje izdavanje krvnih pripravaka za liječenje. Kako bi se uvijek moglo doći do krvnih pripravaka koji su tipizirani proširenom tipizacijom, banke krvi bi trebale nastojati ustrojiti registar davatelja krvi značajne veličine (na primjer, registar davatelja antigen-negativne krvi ili trombocita s tipizacijom alela HPA i eventualno HLA razreda I) [190-193]. Za tu svrhu molekularne metode mogu biti izrazito korisne [194-196].

Jedna od konkretnih situacija u kojima molekularno testiranje alela eritrocitnih antigena ima važnu primjenu i u transfuzijskom liječenju, primjer je pacijentata s multiplim mijelomom, tumorom plazma-stanica. Karakterizira ga pojačana ekspresija CD38, glikoproteina na stanicama imunskog sustava (plazma-stanice te stanice NK i limfociti B i T), koji djeluje kao receptor (za aktivaciju limfocita T) i enzim (hidrolaza) [197,198]. Daratumumab je monoklonsko IgG protutijelo anti-CD38, a vezanjem na CD38 dovodi do apoptoze procesima stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima ili komplementu. Uklanjanjem stanica s glikoproteina CD38 raste sposobnost imunskog sustava za eliminaciju tumora, jer enzimskom aktivnošću CD38 nastaje adenozin immunosupresivnog djelovanja [199,200]. Daratumumab se veže i na molekule glikoproteina CD38 na eritrocitima te pri rutinskom testiranju za klinički važna protutijela dolazi do maskiranja prisutnosti protutijela, pogotovo na antigene iz sustava krvnih grupa Kell [201]. Budući da daratumumab ne utječe na DNA, molekularno testiranje omogućava pacijentima ovisnim o transfuziji krvi da dobiju podudarnu dozu krvi [202].

Različite rutinske serološke tehnike uglavnom ne mogu pouzdano odrediti različite antigene D, produkte sve većeg broja alela *RHD*. Glavne mane koje utječu na postojanje razlika između serološkog i molekularnog testiranja su tehnika seroloških metoda, specifičnost klonova protutijela anti-D koji se upotrebljavaju, kao i broj antigena D na nekim eritrocitima [64,143,203]. Različite države imaju različite smjernice za serološki negativne i slabo pozitivne aglutinacije koje uključuju DNA metode za potvrdu ili zaključak konačnog rezultata [78,87,96,143,178,204]. Glavni cilj tih smjernica je smanjiti rizik aloimunizacije u RhD negativnih primatelja krvnih pripravaka.

## 5.1. Osvrt na populaciju ispitanika

U pripremi ovog istraživanja jedan od prvih zadataka bio je odrediti veličinu uzorka kako bi istraživanje imalo odgovarajuću statističku snagu i razinu značajnosti. Procjena učestalosti alela *RHD* u ispitivanoj populaciji u pripremi je namjerno bila postavljena konzervativno (0,1 %), kako bi u istraživanju bilo dovoljno ispitanika unutar kojih bi se mogao dokazati neki alel *RHD*. Drugi je razlog bio taj, da se u literaturi učestalost znatno razlikuje ovisno o zemljopisnom porijeklu populacije, broju ispitanika te ponekad zbog nejasno definiranog odabira ispitanika (davatelji krvi ili općenito serološki RhD negativni ili serološki nejasni uzorci). Stoga nije bilo moguće odabrati neki stalan broj na temelju objavljenih istraživanja. Bez obzira na to, pogreška procjene pri izračunu veličine uzorka zato je namjerno bila razmjerno velika ( $\pm 0,24$  %) u odnosu na samu procjenu učestalosti (0,1 %), pa je s utvrđenom učestalosti alela *RHD* od 0,28 % u ovom istraživanju zadovoljen okvir pogreške procjene, odnosno projicirane snage istraživanja i razine značajnosti.

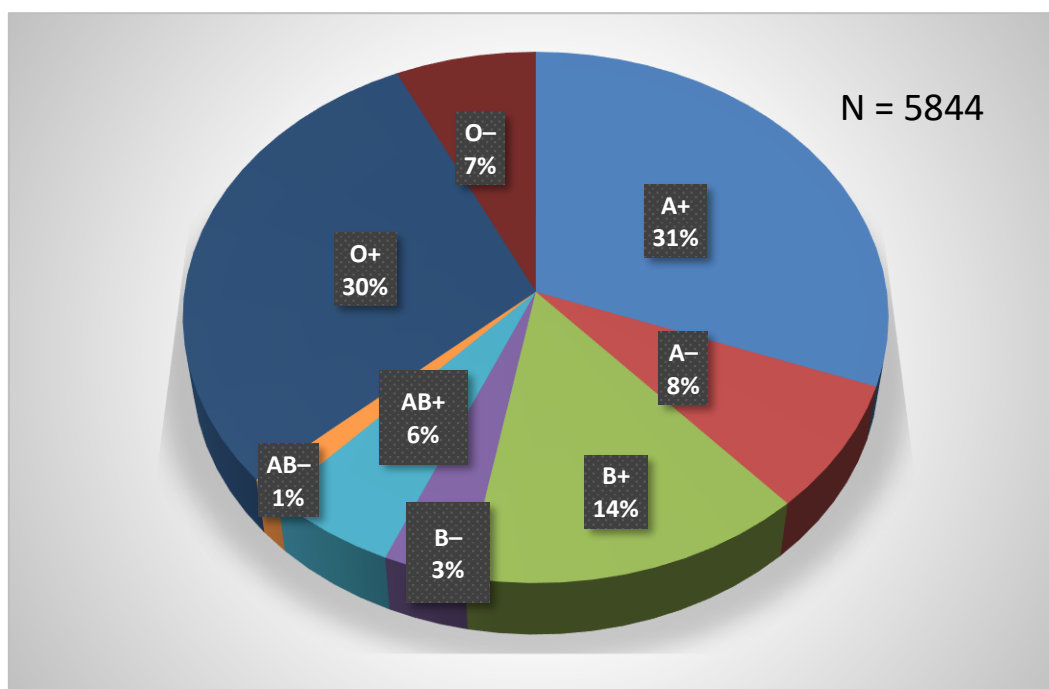
Zanimljivo je, da se u objavljenim radovima učestalost alela vrlo često netočno ili neprecizno definira, pa su time i objavljeni numerički podaci tako definiranih relativnih frekvencija većinom *de facto* netočni [176,205], iako ima i točnih primjera [174,206]. Učestalost alela često se u literaturi definira kao ukupan broj alela (koji je gotovo uvijek jednak broju ispitanika jer se varijante gena *RHD* gotovo uvijek otkrivaju u hemizigota, a samo iznimno u homozigota za lokus *RHD*) podijeljen s ukupnim brojem ispitanika u istraživanju. Taj kvocijent ne definira stvarnu učestalost alela, jer je ona definirana omjerom broja određenog alela i ukupnog broja alela u populaciji. Kao što je definirano u potpoglavlju 3.6., varijabla *ukupan broj alela u populaciji za gene RHD* mora se definirati kao dvostruki broj ispitanika. Budući da je u populacijama RhD negativnih osoba europskog porijekla glavni molekularni mehanizam nastanka tog fenotipa delecija cijelog gena *RHD*, razumije se da ti ispitanici ne mogu imati neki od alela *RHD* [44]. Zbog toga je u tablicama u poglavlju Rezultati učestalost izražena kroz dvije kategorije: (stvarna) učestalost alela u populaciji te učestalost ispitanika s određenim alelom (jer je ta veličina brojčano usporediva s većinom objavljenih radova, unatoč raznim nazivima za učestalost). Neki autori pravilno računaju učestalost genotipova (kao kvocijent broja genotipova i ukupnog broja ispitanika), no iz podataka nije eksplicitno određena učestalost alela [80]. Zbog svega navedenog, kao i cijele palete načina na koje se

predstavljaju rezultati pojedinih istraživanja, zahtjevno je raditi kvalitetne usporedbe istraživanja. Iz objavljenih podataka ponekad je nemoguće shvatiti bez vlastitog (ručnog) računanja koju su relativnu frekvenciju autori prikazali, bez obzira na naziv te veličine.

Populacijska istraživanja davatelja krvi služe kao pokazatelj prisutnosti određenih alela te njihove učestalosti u određenoj populaciji. Zbog brojnosti davatelja krvi i dostupnosti rezultata testiranja, rezultati dobiveni u populacijskim istraživanjima u toj skupini općenito se smatraju relevantnima za cijelu populaciju iz koje davatelji dolaze. Preciznosti radi, općenito je populacija davatelja krvi pristrana (engl. *biased*) prema RhD negativnim osobama jer se u transfuzijskoj medicini potiče davanje RhD negativne krvi, zbog razloga navedenih u poglavlju Uvod. Gledano iz perspektive populacijske genetike, kad bi se rezultati u davatelja krvi preslikali na opće stanovništvo, treba imati u vidu da je moguće da RhD negativnih osoba vjerojatno ima nešto više u populaciji davatelja krvi nego u općoj populaciji. Međutim, iz kliničke perspektive važan je upravo podatak o učestalosti među davateljima krvi, kako bi se pri transfuzijskom liječenju pravilno donosile odluke, s obzirom na to da su davatelji izvor krvi i odgovarajućih krvnih pripravaka za pacijente [174].

Kao potvrda da među njima ne postoji statistički značajna razlika, napravljena je usporedba uzorka populacije ispitanika u ovom istraživanju s ukupnom populacijom RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske. Time je izvršena provjera odgovara li uzorak ispitanika u ovom istraživanju cijeloj populaciji RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske. Prema podacima dobivenima iz nacionalnog sustava za transfuzijsku medicinu, u Odjelu za transfuzijsku medicinu Opće bolnice Varaždin prosječno je na godišnjoj razini (u razdoblju u kojem je provedeno ovo istraživanje) evidentirano 5844 davatelja krvi. Raspodjela davatelja krvi po krvnim grupama sustava ABO i rezultatu za RhD grafički je prikazana na Slici 35. Postoci su zaokruženi na cijeli broj zbog jednostavnosti prikaza. Istraživanje krvnih grupa sustava ABO nije dio ovog istraživanja stoga nije detaljno opisano u ovoj disertaciji. Prosječan godišnji broj u ispitivanom razdoblju samo skupine RhD negativnih davatelja, koji čine predmet ovog istraživanja, bio je 1151 ili 19,70 % ukupnog prosječnog godišnjeg broja davatelja (Tablica 20). Uzorak populacije u ovom istraživanju (704 ispitanika) čini 61,16 % prosječnog godišnjeg broja RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske. U usporedbi očekivane populacije davatelja u uzorku prema učestalosti krvnih grupa sustava ABO i uzorka davatelja krvi u ovom istraživanju, ne postoji statistički značajna

razlika između populacija ( $P > 0,05$ , Tablica 20). Godišnji prosjek broja davatelja krvi obuhvaća broj davatelja krvi u sjeverozapadnoj Hrvatskoj na prosječnoj godišnjoj razini u razdoblju od svibnja 2017. godine do ožujka 2019. godine. Očekivani broj davatelja dobiven je umnoškom učestalosti pojedine krvne grupe u ukupnoj populaciji davatelja s ukupnim brojem ispitanika u ovom istraživanju (704), zaokružen na cijeli broj.



**Slika 35.** Raspodjela davatelja krvi u sjeverozapadnoj Hrvatskoj na prosječnoj godišnjoj razini u razdoblju od svibnja 2017. godine do ožujka 2019. godine. Rezultat testiranja za antigen D prikazan je uz određenu krvnu grupu sustava ABO: „+“ za RhD pozitivan i „-“ za RhD negativan rezultat.

**Tablica 20.** Raspodjela serološki RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske po krvnim grupama sustava ABO prosječno na godišnjoj razini (svibanj 2017. do ožujak 2019.).

Krvna grupa ABO RhD	RhD negativni davatelji krvi, N (%)					Usporedba očekivane populacije i uzorka davatelja krvi u ovom istraživanju
	A-	B-	AB-	O-	Ukupno	
Godišnji prosjek broja davatelja krvi	453 (39,36 %)	204 (17,72 %)	81 (7,04 %)	413 (35,88 %)	1151 (100,00 %)	$\chi^2 = 1,047$ P = 0,789
Očekivani broj davatelja	277	125	50	253	704	
Uzorak davatelja krvi u ovom istraživanju	265 (37,64 %)	125 (17,76 %)	53 (7,53 %)	261 (37,07 %)	704 (100,00 %)	3 stupnja slobode

Rezultat serološkog određivanja antigena D prikazan je uz određenu krvnu grupu sustava ABO oznakom „-“ za RhD negativan rezultat.

## 5.2. Presjek podataka o pronađenim alelima Rh s dosadašnjim istraživanjima

### 5.2.1. Alel *RHD\*DEL32*

Alel *RHD\*01EL.32* (*RHD\*DEL32*) tek je nekoliko puta opisan u literaturi, prvi put u davatelja krvi u Poljskoj [177] i kasnije u Brazilu [204,207]. Prema ISBT-u taj je alel posljedica intronskog SNV-a u intronu 1 u odnosu na *RHD\*01*, c.149-29G>C [11]. S tim su u skladu i rezultati ovog istraživanja dobiveni metodom qPCR, gdje je rezultat bio jednak onome za *RHD\*01* – potvrđena prisutnost svih testiranih egzona *RHD*.

*RHD\*DEL32* odnedavno izaziva određene kontroverze u stručnoj javnosti. Trenutačno se vode rasprave je li baš taj SNV, čije postojanje nije sporno, doista jedini u tom alelu i je li baš taj SNV uzrok DEL fenotipa produkta alela *RHD\*DEL32*. Polimorfizam c.149-29G>C izrazito je čest unutar gena *RHD* prema bazi genomskih sekvenci gnomAD verzije 3.1.2. (Genome Aggregation Database) [170]. Učestalost tog polimorfizma u populacijama europskog porijekla (bez populacije Finske) iznosi visokih 76 % [170]. Polimorfizam (SNP) pronađen u ovom alelu (c.149-29G>C) nosi identitetsku oznaku rs2301153 [11,14], a u bazi genomskih sekvenci gnomAD identitetsku oznaku 1-25284544-G-C [170]. Na relativno visoku učestalost SNV-a c.149-29G>C skrenuli su pozornost Tounsi i sur. 2018. godine [208], koji su metodom NGS definirali i intronske sekvence, te je taj polimorfizam utvrđen u sva 42 uzorka s haplotipovima *DCE*, *DCE* i *Dce*. Kim i sur. u pismu uredniku časopisa *Transfusion* 2021. godine izričito su i oštro zahtijevali da se taj polimorfizam ukloni kao odgovoran za *RHD\*DEL32* s popisa DEL alela zato što zbog visoke učestalosti ne može uzrokovati DEL fenotip [209]. Zalažu se za oprez pri povezivanju intronskih polimorfizama koji nisu unutar mjesta prekrajanja ili oko njega s promjenama u ekspresiji alela. Činjenica je da intuitivno ne može biti točno da je iznimno rijedak alel odgovoran za DEL fenotip nastao kao posljedica isključivo toliko učestalog polimorfizma u DNA u svim populacijama.

U ovom istraživanju utvrđen je alel s dokazanim intronskim polimorfizmom u *RHD*, c.149-29G>C. Je li to i jedini polimorfizam u cijeloj sekvenci gena *RHD*, pitanje je izvan dosega ovog istraživanja. Ekspresija pronađenog alela definitivno je DEL fenotipa unatoč mogućim dodatno utvrđenim intronskim polimorfizmima i bez obzira na to koji će biti konačan naziv tog alela. DEL fenotip potvrđen je negativnim rezultatom u početnom IAT testu te dokazom epitopa RhD u testu adsorpcije i elucije, jednako kao i u izvornom radu



opisa ovog alela iz Poljske autora Orzińska i sur. [177]. Alel s jedinim SNV-om c.149-29G>C ISBT još uvijek priznaje u izvornom opisu, pod nazivom *RHD\*DEL32* [11], stoga se alel kao takav i pod tim nazivom vodi u ovom istraživanju. Pregledom sekvence gena *RHD* u uzorku ispitanika dodatno je potvrđeno da se definitivno ne radi o alelu *RHD\*DEL42*, koji uz SNV c.149-29G>C sadrži i dodatni egzonski polimorfizam zadnjeg nukleotida u egzonu 2, c.335G>C. Kako je u DNA ispitanika utvrđena referentna sekvenca gena *RHD* c.355G, time je otklonjena mogućnost za prisutnost alela *RHD\*DEL42* [11].

Ispitanik s ovim alelom potvrđeno je hemizigotan za lokus *RHD*, Rh-fenotipa Ccee, jednako kao u dosad objavljenim istraživanjima [177,204,207]. Zbog učestalosti haplotipova u populaciji, predviđena je haplotipska povezanost *RHD\*DEL32* s alelom *RHCE\*02* u haplotip *DCe*. Pretpostavljeni genotip ispitanika je *DCe/dce*.

Međutim, još dvije kontroverze oko ovog alela ili polimorfizma odnose se na dva brazilska istraživanja s opisanim slučajevima *RHD\*DEL32*. Prvi je rad autora Dezan i sur. iz 2018. godine, koji eksplicitno tvrde da su dokazali *RHD\*DEL32*, ali polimorfizam navode kao c.336-29G>C [204]. U opasci uz alel *RHD\*DEL32* u bazi alela Rhesusbase (siječanj 2022. godine) stoji da je ISBT dugo baš tako opisivao polimorfizam alela *RHD\*DEL32* u odnosu na *RHD\*01* [60]. U najnovijem popisu alela iz 2021. godine ISBT navodi polimorfizam c.149-29G>C [11]. Vjerojatno je do pogreške došlo zbog donedavne uporabe nomenklature pri imenovanju intronskih polimorfizama u genu *RHD* koja nije bila u potpunosti prema pravilima molekularne biologije. Naime, brojkom treba označiti poziciju nukleotida u najbližem susjednom egzonu, a zatim znakovima – ili + točna pozicija polimorfizma u intronu, ovisno je li intron u smjeru slijedom 5' ili 3' od graničnog egzonskog nukleotida. Intronski polimorfizmi ranije su se označavali s IVS (engl. *intervening sequence*, intron) pa bi takav zapis ovog alela trebao biti *IVS1-29G>C*, jer se radi o polimorfizmu u intronu 1 (*IVS1*). No, izvorni upis sekvence u bazu sekvenci GenBank [14] prema poljskom istraživanju [177] pogrešno je navodio polimorfizam kao *IVS2-29G>C*, što je uočio Wagner u radu [210]. SNV u ovom alelu fizički je bliže granici s egzonom 2, što prikazuje i elektroferogram DNA ispitanika iz ovog istraživanja na Slici 20. Vjerojatno su autori pogrešno protumačili, da bi to trebalo opisati kao intron (*IVS*) 29 pb u smjeru 5' (-29) od početka egzona 2 (zato brojka 2 uz *IVS*). To je ISBT samo „preveo“ u c.336-29G>C, jer je c.336 prvi nukleotid u egzonu 3, susjednome intronu 2, što je točno po pravilima nomenklature polimorfizama, ali

činjenično netočno, jer autori vjerojatno nisu imali namjeru prijaviti takav polimorfizam. U bazi gnomAD stvarno mjesto c.336-29 u genu *RHD* uopće nije polimorfno u više od 140 000 ispitanih sekvenci [170]. S obzirom na sve navedeno, pitanje je koji je alel stvarno otkriven u radu [204], posebno jer autori navode sekvenciranje kao metodu te bi trebali biti sigurni u sekvencu koju su odredili. Nadalje, navode da je alel *RHD\*DEL32* bio u istom genu (?) kao i polimorfizam za najčešći DEL alel u osoba azijskog porijekla (*RHD\*DEL1*, c.1227G>A). Takav potencijalni novi alel s dva polimorfizma (c.149-29G>C i c.1227G>A) ISBT (još) nije priznao, ali je, kao posljedica objave recenziranog rada, ipak uvršten u popis alela u bazi alela *RHD* RHeference [76]. U drugom brazilskom radu iz 2019. godine autora de Paula Vendrame i sur. [207], polimorfizam c.149-29G>C naveden je fenotipski zajedno s polimorfizmom za grupu DAU-alela *RHD* c.1136T>C. Autori tog istraživanja navode mogućnost da se ipak radi o dva zasebna alela, od koji je svaki na posebnom homolognom kromosomu. Polimorfizme su dokazivali metodom kojom se ne mogu odrediti haplotipovi, stoga nije bilo moguće odrediti radi li se o *cis*- ili *trans*-poziciji polimorfizama na homolognim kromosomima.

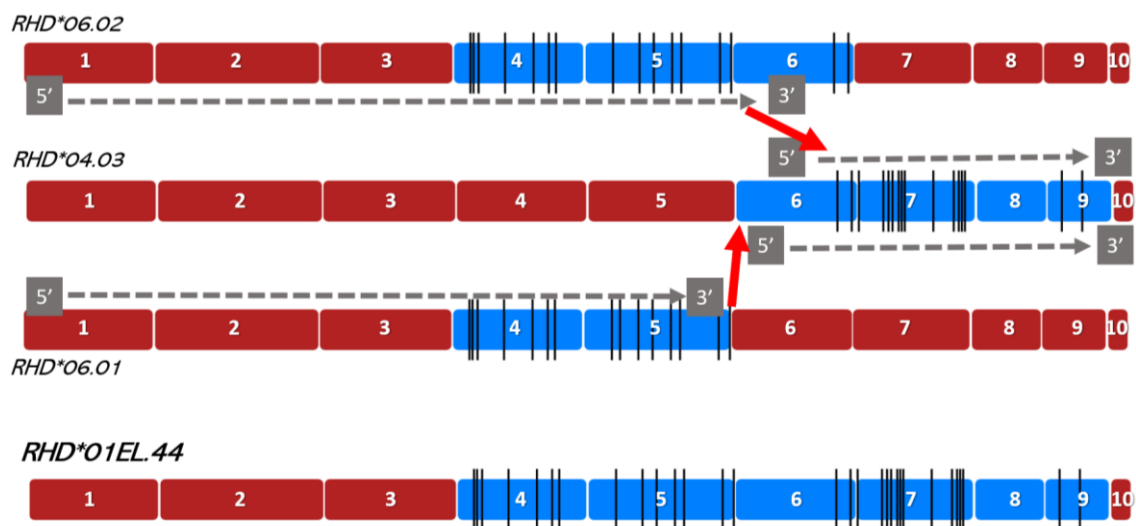
U ovom istraživanju nije bilo moguće precizno utvrditi genski razlog zašto je uzorak tog ispitanika serološki reagirao negativno i u direktnoj aglutinaciji i u IAT-u. Uz službenu nomenklaturu ISBT-a odgovor bi bio jasan – u uzorku je prisutan antigen D DEL fenotipa i zato je serološki rezultat bio takav. Nakon raspravljenih činjenica i kontroverzi, ono što se definitivno može potvrditi jest, da eritrociti tog ispitanika imaju ekspresiju antigena D DEL fenotipa. Alel koji kodira taj antigen ne razlikuje se od *RHD\*01* u sekvencama egzona, te je dokazana prisutnost polimorfizma c.149-29G>C (pokazalo se to u konačnici važno u definiranju ekspresije alela ili ne). Na temelju tih rezultata, nalaz ispitanika kao davatelja krvi promijenjen je u RhD pozitivan, kako bi se krvni pripravci tog davatelja ubuduće mogli korektno izdavati RhD pozitivnim pacijentima. Bilo bi korisno istražiti sekvencu svih introna *RHD* u tom uzorku, jer je moguće da tamo leži odgovor na pitanje zbog čega produkt tog alela ima DEL fenotip. Intronske sekvence, pogotovo blizu mjesta prekrajanja (što je situacija i u uzorku iz ovog istraživanja), mogu djelovati na regulaciju transkripcije te polimorfizmi u njima mogu utjecati i na fenotip produkta gena [211]. Ciljano sekvenciranje (engl. *targeted sequencing*) metodom NGS moći će pružiti bolji uvid u eventualni genski uzrok DEL fenotipa [212]. Taj uzrok sigurno nije u sekvencama pojedinih egzona *RHD*, što je potvrđeno i ovim istraživanjem.

### 5.2.2. Alel *RHD\*DEL44*

Alel *RHD\*01EL.44* (*RHD\*DEL44*) predstavnik je skupine klasičnih velikih hibridnih alela (engl. *large hybrid allele*), strukture *RHD\*D-CE(4-9)-D*. Naziv te grupe alela potječe od pretpostavke mehanizma njihova nastanka. U tim hibridima velik je dio pojedinog gena zamijenjen sekvencom drugog paraloga. U pravilu je to konverzija dijela gena *RHD* sekvencom gena *RHCE*, iako postoje i obrnuti slučajevi gdje je dio gena *RHCE* zamijenjen sekvencom gena *RHD*. Mehanizam konverzije gena za alel *RHD\*DEL44* mogao je biti takav da je gen *RHD* preuzeo slijed nukleotida gena *RHCE* u egzonima od 4 do 9. Slika 26 daje još jedan potencijalni odgovor na pitanje kako je tijekom evolucije došlo do nastanka tog hibridnog alela. Moguće je da je nastao kao posljedica nerekipročnog crossing-overa između dvaju također hibridnih alela *RHD* (Slika 36):

- *RHD\*06.02* (*RHD\*DVI.2*), strukture *RHD\*D-CE(4-6)-D* ili *RHD\*06.01* (*RHD\*DVI.1*), strukture *RHD\*D-CE(4-5)-D* te
- *RHD\*04.03* (*RHD\*DIV.3*), strukture *RHD\*D-CE(6-9)-D*.

Navedeni aleli skupine *RHD\*06* relativno su učestali. Alel *RHD\*06.02* jest i prvi alel *RHD* parcijalnog fenotipa D kojemu je opisana struktura još 1994. godine u Francuskoj [213].



**Slika 36.** Hipotetski mehanizam nastanka alela *RHD\*01EL.44* crossing-overom između jednog od alela skupine *RHD\*06* i *RHD\*04.03*. Crvene strelice označavaju mjesta crossing-overa. Isprekidane crte označavaju sekvencu DNA u alelu *RHD\*01EL.44* u smjeru 5'→3' kao dio njegovih pretpostavljenih prethodnika. Crvene sekvence potječu od *RHD*, plave od *RHCE*. Svaka crna crta prikazuje jedan SNV, razlike u odnosu na sekvencu *RHD\*01*.

Oba alela skupine *RHD\*06* relativno su česta u populacijama europskog porijekla, najviše u zapadnoj i srednjoj Europi [76]. Oba su pronađena i u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, *RHD\*06.02* u tri davatelja krvi, a *RHD\*06.01* u jednog davatelja krvi, u dodatnom istraživanju nastalom proširenjem ovog istraživanja na C- i/ili E-pozitivne uzorke s pozitivnim rezultatom u indirektnom antiglobulinskom testu [214]. Alel *RHD\*04.03* rijedak je, opisan je u samo nekoliko slučajeva u Švicarskoj i jugozapadnoj Njemačkoj (Baden-Württemberg) [76]. Zemljopisna se područja alela *RHD\*04.03* i skupine *RHD\*06* preklapaju pa nije isključeno da je alel *RHD\*DEL44* nastao i tim mehanizmom.

Sva tri navedena alela koji su eventualno mogli biti preteča alela *RHD\*DEL44*, serološki reagiraju u rasponu od slabe do jako pozitivne reakcije [76]. Prema nomenklaturi ISBT-a svi su uvršteni u skupinu alela parcijalnih D [11]. S druge strane, *RHD\*DEL44* svrstan je u skupinu alela DEL fenotipa [11]. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja njegova ekspresija bila je ili DEL ili RhD negativnog fenotipa [76]. Taj podatak upućuje na općeniti problem nomenklature alela sustava Rh, taj da iz naziva alela nije moguće predvidjeti (sve) načine ekspresije tog alela.

Prema podacima iz literature, ovo istraživanje prvi je opis alela *RHD\*DEL44* s ekspresijom DEL fenotipa u populaciji europskog porijekla i uopće izvan Kine. Do sada je naime DEL fenotip produkta ovog alela opisan samo u Kini [80,205,215]. U svim ostalim opisima, testom adsorpcije i elucije nije potvrđena prisutnost antigena D ili taj test uopće nije bio primjenjen. Radi se o populacijama također u Kini [206], ali i bliže Hrvatskoj, u (Gornjoj) Austriji [176], Švicarskoj [149,150] i Portugalu [216], te izvan Europe u populacijama Australije [217], Indije [218], Argentine [219] i Tajlanda [220]. Sva istraživanja popisana su u Tablici 21.

U tajlandskom istraživanju, autora Thongbut i sur. [220], jedan je ispitanik bio homozigot *RHD\*DEL44,\*DEL44*, što je općenito iznimna rijetkost s varijantama gena *RHD*. U švicarskom istraživanju autora Gowland i sur. [149], opisana je situacija iz Berna gdje su pronađeni aleli *RHD\*DEL44* u dvoje davatelja. Eksplicitno je navedeno da bi svaka *a priori* tvrdnja o tome, da su veliki hibridni aleli nedvojbeno odgovorni za isključivo RhD negativan fenotip, pogrešno ignorirala rezultate ranijeg istraživanja iz Kine autora Li i sur. [80] gdje je adsorpcijom i elucijom dokazana prisutnost antigena D. U Švicarskoj nisu izvodili test adsorpcije i elucije jer se po tadašnjim kriterijima ISBT-a hibridni alel strukture *RHD\*D-CE(4-9)-D* smatrao odgovornim za RhD negativan fenotip.

**Tablica 21.** Dosadašnji opisi fenotipova kao posljedice ekspresije alela *RHD\*01EL.44*.

Država	Fenotip <i>RHD*01EL.44</i>	Test adsorpcije i elucije *	Godina objave	Istraživanje
Kina	DEL	Anti-D	2009.	[80]
Kina	DEL	Anti-D	2015.	[205,215]
Hrvatska	DEL	Anti-D	2022.	[214] ovo istraživanje
Austrija	RhD negativan	Negativan	2009.	[176]
Portugal	RhD negativan	Nije izvođen	2009.	[216]
Kina	RhD negativan	Negativan	2009.	[206]
Švicarska	RhD negativan	Nije izvođen (zbog tadašnje klasifikacije)	2014.	[149,150]
Australija	RhD negativan	Negativan	2014.	[217]
Indija	RhD negativan	Negativan	2018.	[218]
Argentina	RhD negativan	Nije izvođen	2019.	[219]
Tajland	RhD negativan	Nije izvođen	2020.	[220]

\* Anti-D u eluatu dokazuje antigen slabog D ili DEL fenotipa na eritrocitima ispitanika.

U međuvremenu je taj kriterij izmjenjen, barem za *RHD\*DEL44*. Međutim, i dalje ostaju rezultati drugih istraživanja u kojima je alel pokazivao ekspresiju RhD negativnog fenotipa, uz potvrdu testom adsorpcije i elucije (Tablica 21).

U uzorku iz ovog istraživanja pretpostavljeni haplotip s alelom *RHD\*DEL44* čini alel *RHCE\*02* (*\*Ce*) u haplotipu *DCe*, određen u uzorku fenotipa *Ccee* uzimajući u obzir učestalost haplotipova. U egzonomima specifičnima za *RHD* (egzoni 1, 2, 3 i 10) nije utvrđena razlika u sekvenci u odnosu na *RHD\*01*. Kako je testom adsorpcije i elucije dokazana prisutnost antigena D na eritrocitima ispitanika, pretpostavljeni je genotip *DCe/dce*, a antigen D jest DEL fenotipa. Taj se podatak podudara s većinom dosad objavljenih istraživanja, osim djelomično sa švicarskima u kojima je određen haplotip *DcE* [149,150]. Budući da je kao produkt alela *RHD\*DEL44* u ovom istraživanju dokazan antigen D DEL fenotipa, serološkim tehnikama nije bilo moguće dokazati antigen ispitanika u rutinskom testiranju. Na temelju tog rezultata, i tom je ispitaniku kao davatelju promijenjen nalaz u RhD pozitivan, kako bi se krvni pripravci tog davatelja mogli ubuduće korektno izdavati RhD pozitivnim pacijentima. Potpuno jednaki rezultati fenotipa, haplotipa i testa adsorpcije i elucije uzorka iz ovog istraživanja dobiveni su i u prvom opisu alela *RHD\*DEL44* [80].

Na Slici 26 uočava se da program HiType nije prikazivao sekvencu egzona 6 *RHD\*DEL44*. Razlog je jednaka sekvenca egzona 6 *RHD\*DEL44* i dvaju alela *RHCE* također prisutnih u uzorku (Slika 37). Radi lakše vizualizacije jednakih triju sekvenci, svaki nukleotid označen je različitim bojom. Postoji razlika u sekvencama između egzona 4 do 9 alela *RHD\*01* i *RHD\*DEL44* (označeno valovitom crtom na Slici 37). Egzon 10 u alelu *RHD\*DEL44* potječe iz *RHD*, dokazano polimorfizmom prema *RHCE* u 3'UTR. Razlika sekvence oko egzona 6 *RHD* i *RHCE* samo je u dva nukleotida prema 3'-kraju egzona 6, c.916G>A (p.306V>I) i c.932A>G (p.311Y>C), gdje je prva sekvenca iz *RHD*, a druga iz *RHCE*, s obzirom na to da sva četiri glavna alela *RHCE* imaju jednaku sekvencu na tim dvjema pozicijama [14,170]. Ukupno su u egzonima alela *RHD\*DEL44* promijenjena 33 nukleotida koja dovode do supstitucije 27 aminokiselina [60].

Egzon	1						2				3				4					
Pozicija u cDNA	48	150	178	201	203	307	361	380	383	455	505	509	514	544	577	594				
<i>RHD*01</i>	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	T	A	T	G	A				
<i>RHD*D-CE(4-9)-D (RHD*DEL44)</i>	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	C	G	T	A	A	T				
<i>RHCE*01 (*ce)</i>	G	C	C	A	A	C	A	C	G	C	C	G	T	A	A	T				
<i>RHCE*02 (*Ce)</i>	C	T	A	G	G	T	A	C	G	C	C	G	T	A	A	T				

Egzon	4						5				6		7			
Pozicija u cDNA	602	636	667	676	697	712	733	744	787	800	916	932	941	968	974	979
<i>RHD*01</i>	C	C	T	G	G	G	G	C	G	A	G	A	G	C	G	A
<i>RHD*D-CE(4-9)-D (RHD*DEL44)</i>	G	C	G	G	C	A	C	T	A	T	A	G	T	A	T	G
<i>RHCE*01 (*ce)</i>	G	C	G	G	C	A	C	T	A	T	A	G	T	A	T	G
<i>RHCE*02 (*Ce)</i>	G	C	G	G	C	A	C	T	A	T	A	G	T	A	T	G

Egzon	7						9				10		3'UTR			
Pozicija u cDNA	985	986	989	992	1025	1048	1053	1057	1059	1060	1061	1170	1193	1227	1250	1273
<i>RHD*01</i>	G	G	A	A	T	G	C	G	A	G	C	T	A	G	T	A
<i>RHD*D-CE(4-9)-D (RHD*DEL44)</i>	C	A	C	T	C	C	T	T	G	A	A	C	T	G	T	A
<i>RHCE*01 (*ce)</i>	C	A	C	T	C	C	T	T	G	A	A	C	T	G	T	G
<i>RHCE*02 (*Ce)</i>	C	A	C	T	C	C	T	T	G	A	A	C	T	G	T	G

**Slika 37.** Usporedba sekvenci alela *RHD\*01* (referentna sekvenca *RHD*), *RHCE\*01* (referentna sekvenca *RHCE*) i *RHCE\*02* s alelom *RHD\*DEL44* prema polimorfim pozicijama u egzonima. Crni krugovi označavaju sekvence prisutne u ispitanika fenotipa Ccee s alelom *RHD\*DEL44*. Izvori podataka: sekvenca *RHD\*DEL44* ispitanika iz ovog istraživanja iz programa HiType, za referentne sekvence baza genoma gnomAD [170] i baza sekvenci GenBank [14], za polimorfizam *RHCE\*02* popis alela *RHCE* ISBT-a [13].

Početicama za sekvenciranje specifičnim za *RHD* nemoguće je stoga sekvencirati egzon 6 alela *RHD\*DEL44* u prisutnosti još dviju jednakih sekvenci (dvaju alela *RHCE* također prisutnih u DNA). Ukupno su prisutne tri potpuno jednake sekvence egzona 6 gena sustava Rh u uzorku ovog ispitanika, hemizigotnog za lokus *RHD*. Prema navodima prof. Christopha Gassnera, suvoditelja Radne skupine za imunogenetiku eritrocita i nazivlje krvnih grupa ISBT-a i jednog od suautora obaju radova, i u Švicarskoj je bilo problema sa sekvenciranjem egzona 6 alela *RHD\*DEL44*, koji su u istraživanjima [149,150] bili u uzorcima neuobičajenog Rh-fenotipa za ovaj alel – ccEe. Takve hibridne strukture gena sustava Rh u metodama NGS otežavaju nedvosmisleno pravilno poravnanje (engl. *alignment*) genske sekvence u ispitivanom uzorku uz odgovarajući gen sustava Rh [112].

### 5.2.3. Hibridni alel na lokusu *RHCE*

Metodom qPCR u jednom *RHD* negativnom uzorku fenotipa Ccee na lokusu *RHCE* utvrđen je hibridni alel strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*, odnosno *RHCE\*D(1)-CE*. U ovom istraživanju *RHD* negativnoj osobi s alelom te strukture prvi put su na svjetskoj razini potvrđeni epitopi RhD na membrani eritrocita testom adsorpcije i elucije.

Hibridni alel te strukture do sada je u literaturi opisan četiri puta, triput u Kini 2004. [221], 2007. [222] i 2017. godine [223] te u Sloveniji 2005. godine [87]. Kao zanimljivost, moguće je da zbog zemljopisne blizine postoji lokalni bazen tog alela, s obzirom na to da su osobe s tim alelom iz Slovenije bile s područja Ptuja koji je od Varaždina udaljen četrdesetak kilometara [87]. Dosadašnji rezultati o fenotipu uzoraka s tim alelom opisivali su RhD negativan fenotip. To je bilo i očekivano jer je u istraživanju autora Shao i Xiong kad je prvi put definiran, napravljen test adsorpcije i elucije koji je bio negativan [221].

U istraživanju slovenskih uzoraka [87] alel je potvrđen metodom PCR-SSP te, osim negativnih rezultata za ostale egzone *RHD*, nisu objavljeni rezultati istraživanja testom adsorpcije i elucije. Pronađeno je čak 13 uzoraka s tim alelom, svi su pokazali negativnost za uzvodni Rh-okvir, što je upućivalo na to da je riječ o alelu na lokusu *RHCE*. U svim slovenskim uzorcima potvrđen je SNV c.-132G>A. To je pravilno protumačeno kao polimorfizam u genu *RHCE* (u kojem je divlji tip c.-132G), iako je sekvenca c.-132A prisutna kao divlji tip u genu *RHD*. Ta pozicija u DNA ima i funkciju mjesta vezanja početnica za egzon 1 *RHD* u testu metodom qPCR (Prilog 2) te početnica za egzon 1 *RHD* u početnoj PCR reakciji SBT. Oba su testa upotrebljavana u ovom istraživanju.

U drugom istraživanju iz Kine, Ye i sur. [222], alel je potvrđen metodom PCR-SSP u populaciji RhD negativnih davatelja krvi. U istraživanju je napravljen test za zigotnost lokusa *RHD*, no nije precizirano odnosi li se to i na ispitanika s tim alelom, zbog čega nije jasan njegov rezultat zigotnosti. Napravljen je i test adsorpcije i elucije, koji je bio negativan. Najnovije kinesko istraživanje autora Ji i sur. [223] zanimljivo je po tome što je alel te strukture otkriven u serološki RhD pozitivnih i slabih fenotipova D. Alel je bio u hemizigotnih (heterozigotnih?) osoba za lokus *RHD*, u RhD pozitivne osobe s alelom *RHD\*01*, a u osobe fenotipa slabog D s alelom koji se od *RHD\*01* razlikuje po deleciji unutar okvira čitanja c.79-81delCTC (ISBT nije još službeno priznao taj alel, tako da nema službene nomenklature).

U istraživanju s uzorcima iz Slovenije, Gassnera i sur. [87], navodi se da alel strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*, opisan u kineskom istraživanju autora Shao i Xiong [221], pokazuje dodatnu specifičnost za *RHD* zbog prisutnosti uzvodnog Rh-okvira i pretpostavlja različit molekularni mehanizam nastanka alela opisanih u tim dvama istraživanjima. No u kineskom istraživanju [221], u formi pisma uredniku, navedeno je upravo suprotno. Mehanizam delecije *RHD* i Rh-okvire opisali su 2000. godine Wagner i Flegel [44]. Komercijalni setovi za testiranje nisu bili dostupni 2004. godine u vrijeme objave prvog kineskog istraživanja te je svaki laboratorij izvodio svoje modele testiranja zigotnosti lokusa *RHD*. Shao i Xiong detaljno opisuju testiranje sekvence nizvodnog okvira [221]. Uvodno navode, doduše, da u uzorku postoji nizvodni Rh-okvir. Međutim, nakon četiri različita postupka PCR testiranja, zaključuju da u uzorku nije dokazan egzon 10 gena *RHD* te da nedostaje i 5'-kraj nizvodnog okvira. Autori su naveli hipotezu, jer eksperimentalno nisu to opovrgnuli, da je moguće da se radi o alelu gena *RHCE*. Dodatno su pokazali, negativnim rezultatom u PCR reakciji specifičnoj za intron 2 gena *RHD*, da egzon 2 tog alela, pozitivan u testu PCR-SSP za egzone *RHD*, najvjerojatnije potječe od alela *RHCE\*02* (*\*Ce*), iako egzoni 2 obaju gena imaju iste sekvence.

O trenutačno neprimjerenosti uređenosti baza podataka za prisutnost i učestalost varijanti gena sustava Rh u pojedinim populacijama govori i podatak da baza alela RHeference u popisu literature za taj alel spominje i tri istraživanja koja opisuju potpuno inverzne alele [76]. Radi se o alelima u kojima je egzon 1 iz *RHCE*, a ostali egzoni iz *RHD*, strukture *RHD\*CE-D(2-10)*, odnosno *RHD\*CE(1)-D*, što potvrđuju opis i slika u članku Westhoff i sur. (pritom su suautorice jedna od najcitiranijih imena u ovom području transfuzijske medicine – Connie Westhoff, Jill Storry, Marion Reid) [224]. Znajući ono što je danas



poznato, definirani alel vjerojatno je bio *RHD\*01.01* jer je opisan egzon 1 iz gena *RHCE* zbog p.16Cys (c.48C), što je jedina razlika alela *RHD\*01.01* od standardnog *RHD\*01*.

Testom zigotnosti lokusa *RHD* ispitaniku u ovom istraživanju dokazana je homozigotnost za deleciju lokusa *RHD*. Eksperimentalno nije eksplicitno pokazano koji je od dvaju alela *RHCE* u ovog ispitanika modificiran, odnosno u kojem se od njih nalazi odsječak sekvence *RHD*. Dvije potencijalne strukture genotipa *RHCE* ispitanika prema rezultatima ovog istraživanja, testiranja metodom qPCR, shematski su prikazane na Slici 31. Genotip ispitanika može biti *dCe/d(ce)<sub>var</sub>* (Slika 31; opcija 1) ili *d(Ce)<sub>var</sub>/dce* (Slika 31; opcija 2), pri čemu indeks *var* označava promijenjeni alel na lokusu *RHCE*, hibridni alel strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*.

Ovo istraživanje prvi put je na svjetskoj razini pokazalo da ispitanik s tim hibridnim alelom, koji uopće nema lokus *RHD*, na eritrocitima ima epitop ili epitope RhD.

Rezultati testa adsorpcije i elucije za identifikaciju protutijela anti-D eluiranih s eritrocita do ovog su istraživanja za produkt ovog alela objavljeni samo u dva kineska istraživanja i oba puta rezultat je bio negativan [221,222]. U ovom istraživanju test adsorpcije i elucije izveden je dvaput. Reaktivnost protutijela anti-D eluiranih s eritrocita ispitanika bila je 2+. Nažalost, nije bilo moguće dobiti odgovor proizvođača reagensa anti-D postoji li mogućnost vezanja paratopa protutijela anti-D koje smo upotrebljavali u testiranju na epitop ili epitope antigena D koje kodira egzon 1 ili eventualno egzoni 1 i 2 gena *RHD*. Nije objašnjeno je li to podatak koji proizvođač nema jer nikad nisu radili takva istraživanja ili im taj podatak uopće možda nije ni bio poznat zbog još nedovoljno definirane stvarne trodimenzionalne strukture antigena D [21,33,34,36,72,73]. Jedina dodatno dobivena informacija bila je koji se klonovi vežu na pojedine epD [70]. Budući da su epD opisani samo prema reaktivnosti pojedinih klonova anti-D te nisu stvarni epitopi RhD, ta se informacija nije pokazala relevantnom za objašnjenje rezultata. Slično su odgovarali i drugi kontaktirani proizvođači protutijela anti-D. Jedino bi se izravnim dokazivanjem veze paratop protutijela – epitop antigena, odnosno dokazom da je epitop na koji se veže paratop protutijela anti-D kodiran sekvencom *RHD* mogao potpuno objasniti mehanizam nastanka dobivenog pozitivnog rezultata u testu adsorpcije i elucije. Taj podatak mogao bi objasniti zašto početnim serološkim testiranjem nije bilo moguće dokazati postojanje epitopa RhD jer je moguće da konkretan reagens anti-D ne veže epitop ili epitope RhD prisutne u uzorku.

U nedostatku navedenih informacija test adsorpcije i elucije hotimice je napravljen dvaput, iz dva neovisna uzorka krvi ispitanika. Potvrdni test provodila je druga osoba i s drugim serijama reagenasa te je ponovno identificirano protutijelo anti-D eluirano s eritrocita ispitanika. Ujedno je oba puta testiran i posljednji supernatant nakon ispiranja usporedno s eluatom, kao potvrda da je protutijelo anti-D otkriveno u eluatu stvarno eluirano s eritrocita i ne predstavlja nevezano slobodno protutijelo iz seruma ispitanika. Supernatant bio je negativan, u njemu nije dokazano protutijelo anti-D. Time je konačno potvrđeno da je protutijelo anti-D u testu bilo zaista vezano na eritrocite ispitanika i smanjena je mogućnost ljudske pogreške pri izvođenju testa, čime je dodatno povećana sigurnost u objavljeni rezultat dokazanog protutijela anti-D. Nakon dobivenih rezultata ispitaniku je promijenjen nalaz kao davatelja krvi, bez obzira na to što uopće nema gen koji kodira protein RhD, kako njegove doze ne bi ubuduće mogle imunizirati RhD negativne primatelje transfuzija krvi.

Primjena NGS tehnologije u imunohematologiji tek je u začetku. Trenutno se vode rasprave oko implementacije metode i algoritama kojima bi se mogla pravilno odrediti zigotnost alela sustava Rh te poravnati hibridni aleli. Zasad se NGS ne provodi rutinski, ne postoje komercijalni testni setovi, ograničen je na vrlo malen broj istraživačkih laboratorija te je testiranje alela sustava Rh još uvijek vrlo skupo. Zbog navedenih razloga nije bilo mogućnosti sekvenciranja tog uzorka, što je definitivno jedan od budućih ciljeva, kako bi se potvrdile ili pak opovrgnule hipoteze o strukturi hibridnog alela navedene u nastavku.

Za definiciju hibridnih alela na lokusu *RHCE* važno je odrediti točna mjesta prekida (engl. *break points*) sekvence *RHD* unutar alela *RHCE* te precizirati koji je alel *RHCE* modificiran sekvencom gena *RHD*. Potrebno je opisati i tip mutacije u genu *RHCE* (kalupna mutacija – makrokonverzija/mikrokonverzija ili nekalupna mutacija). Važno je objasniti situaciju pozitivnog rezultata za dokaz protutijela anti-D u testu adsorpcije i elucije, odnosno utvrditi mehanizam kojim se protutijelo anti-D moglo vezati na modificirani protein RhCE. Naposljetku, u vezi s budućom službenom nomenklaturom ISBT-a, potrebno je opisati u koju će skupinu glavnih alela *RHCE* pripadati taj hibridni alel.

Ovo istraživanje ponudilo je dovoljno snažne rezultate za postavljanje vjerodostojnih hipoteza i teorija koje bi mogle odgovoriti na ta pitanja.

Do sada u literaturi za ovaj alel nisu opisana mjesta prekida sekvence *RHD* unutar gena *RHCE*. Shao i Xiong [221] na temelju svojih rezultata stvorili su hipotezu gdje je došlo do crossing-overa, jer su taj alel smatrali alelom *RHD*, uz napomenu da je moguće da se radi o alelu *RHCE*. U ovom istraživanju amplifikacijom sekvence hibridnog Rh-okvira dokazan je alel na lokusu *RHCE*, pa crossing-over između gena *RHCE* i *RHD* nije realistična mogućnost nastanka, već je to najvjerojatnije konverzija gena kojom su nastala dva mjesta prekida (Slika 8A). Na tu tvrdnju upućuje rezultat testa zigotnosti lokusa *RHD*. Da se radi o nrecipročnom crossing-overu čija bi posljedica bila jedno mjesto prekida, dio sekvence hibridnog alela 5' od mjesta crossing-overa bio bi iz jednog homologa, a 3' od mjesta crossing-overa iz drugog homologa. Kad bi crossing-over bio mogući mehanizam nastanka, bila bi prisutna ili sekvenca uzvodnog ili nizvodnog okvira. S obzirom da je u DNA ispitanika potvrđen isključivo hibridni okvir, to nije moguće.

Iz Slike 31 može se zapaziti da iz dobivenih rezultata testiranja metodom qPCR na samom početku analize rezultata postoje dvije mogućnosti. U Tablici 15 navedeni su svi polimorfizmi alela sustava Rh ovog ispitanika određeni metodom qPCR. Polimorfizmi u egzonomima 3 i 5 nisu relevantni za ovu raspravu, jer su to po rezultatu ovog istraživanja definitivno i nedvojbeno egzoni gena *RHCE* u hibridnom alelu. Polazišni aleli modificirani sekvencom gena *RHD* jesu *RHCE\*01* (\**ce*) ili *RHCE\*02* (\**Ce*). Dokazani su serološki fenotipom C<sub>cee</sub> i metodom qPCR koja je potvrdila polimorfizme koji ih kodiraju. Glavni rezultat testiranja ovog uzorka metodom qPCR jest potvrda za SNV c.-132G>A, sekvencu koja je inače karakteristična za *RHD*. Hibridni alel stoga ima potvrđenu sekvencu c.-132A jer ona nije specifična za alele *RHCE* koji imaju c.-132G.

Zato je sigurno da je 5'-kraj odsječka *RHD* u sekvenci hibridnog alela na neodređenoj poziciji u smjeru 5' od c.-132 unutar 5'UTR (uključujući i tu poziciju) i 3' od uzvodnog okvira čija sekvenca dokazano ne postoji u DNA ovog ispitanika. Što se tiče 3'-kraja odsječka sekvence gena *RHD*, u teoriji postoji nekoliko opcija. U nastavku su opisane njihove podudarnosti s dobivenim rezultatima. Rezultati koji se moraju uzeti u obzir u svakoj teoriji jesu pozitivne probe za *RHCE* c.48G, uobičajeno u alelima za antigen c, te *RHCE* c.48G>C, uobičajeno u alelima za antigen C (Slika 30A). Prednje početnice (engl. *forward primers*) amplikona na koje su vezane te probe specifično se vežu baš na te polimorfizme, a stražnje su početnice (engl. *reverse primers*) diskriminatorne za sekvencu introna 1 specifičnu za *RHCE*.

Prva opcija – hibridni alel kodira antigen c, (ce)<sub>var</sub>

Genotip takva uzorka bio bi *RHCE\*D-CE(2-10) / RHCE\*02 (\*Ce)* odnosno *dCe/d(ce)<sub>var</sub>* (Slika 31; opcija 1). Ova opcija nije u skladu s dobivenim rezultatima.

Ključan čimbenik koji tu opciju čini iznimno malo vjerojatnom jesu pozitivni rezultati dviju proba za SNV u genu *RHD* c.48G>C. Tim se probama određuje polimorfizam inače prisutan u alelima *RHD\*01.01*, *RHD\*10.13* i *RHD\*09.04*, a upravo je po ovom posljednjem, najučestalijem od navedena tri alela, proba u testu dobila naziv [76]. Početnice za tu reakciju vežu se na sekvence c.-132A i c.48C, što daje specifičnost za *RHD*. Da je sekvencom *RHD* modificiran alel *RHCE\*01 (\*ce)*, uobičajene sekvence c.48G, to bi podrazumijevalo negativan rezultat probe *RHD* c.48G>C. Postoje, doduše, rijetke varijante *RHCE\*01* s c.48G>C, koji može utjecati na slabiju ekspresiju antigena e, što nije utvrđeno u serološkom rezultatu uzorka ispitanika [102]. Tada bi za objašnjenje pozitivnog rezultata probe *RHCE* c.48G preostalog alela, *RHCE\*02 (\*Ce)*, on također trebao biti rijetka varijanta jer je uobičajena sekvenca u alelu *RHCE\*02* c.48C.

U skladu s navedenim, opcija da se odsječak *RHD* nalazi umetnut u alel *RHCE\*01 (\*ce)* koji kodira za polimorfizam antigena c, nije vjerojatna.

Druga opcija – hibridni alel kodira antigen C, (Ce)<sub>var</sub>

Genotip takva uzorka bio bi *RHCE\*D-CE(2-10) / RHCE\*01 (\*ce)* odnosno *d(Ce)<sub>var</sub>/dce* (Slika 31; opcija 2). Ova je opcija u skladu s dobivenim rezultatima.

S obzirom na pozitivan rezultat proba za SNV *RHD* c.48G>C, čini se najizglednijom upravo ova opcija. Taj polimorfizam mora biti prisutan u hibridnom alelu, jer je on vezan u *cis*-poziciji u ampliconu s polimorfizmom c.-132A koji je karakteristika gena *RHD*. Polimorfizam *RHCE* c.48G>C uobičajeno je prisutan u alelu *RHCE\*02 (\*Ce)*, što bi u ovom slučaju značilo da također potječe iz hibridnog alela. Taj amplicon počinje na 5'-kraju početnicom specifičnom za c.48C, a na 3'-kraju ga omeđuje specifični polimorfizam za *RHCE* u intronu 1. Preostali dokazani SNV *RHCE* c.48G bio bi u toj situaciji iz alela *RHCE\*01 (\*ce)*.

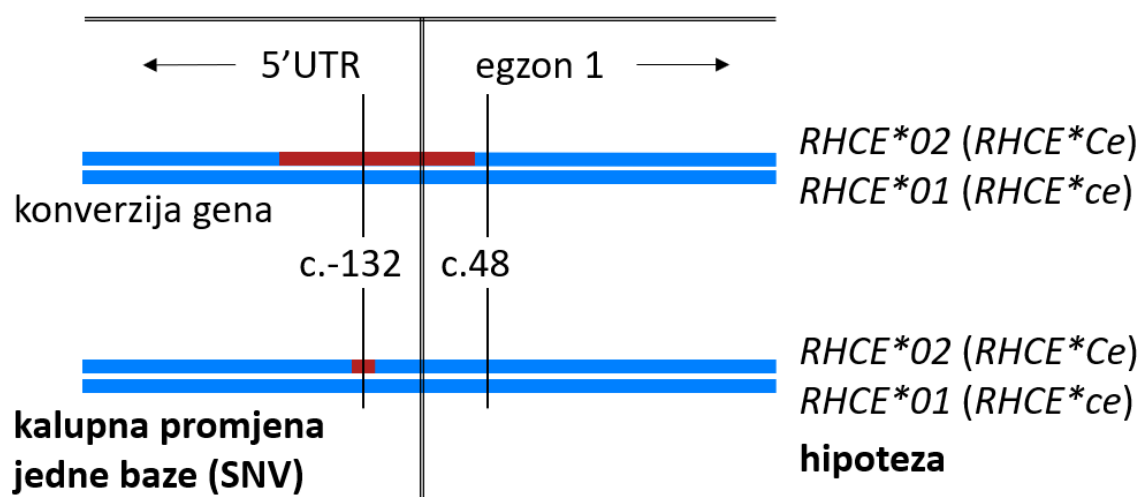
Time su svi polimorfizmi navedeni u Tablici 15 pobrojani i dodijeljeni odgovarajućim alelima, stoga je ova opcija najvjerojatnija.

Kombinacija rezultata dviju proba *RHD* c.48G>C i *RHCE* c.48G>C, kao i činjenica da je promijenjen najvjerojatnije alel *RHCE\*02* (*\*Ce*), omogućuje i dvije hipoteze za 3'-kraj odsječka sekvence gena *RHD* u hibridnom alelu ispitanika iz ovog istraživanja. Prema prvoj, najvjerojatnijoj hipotezi, 3'-kraj odsječka *RHD* u sekvenci hibridnog alela nalazi se na neodređenoj poziciji u smjeru 5' od c.48 unutar egzona 1 ili 5'UTR. Budući da c.48 u hibridnom alelu potječe od *RHCE\*02* (*\*Ce*), 3'-kraj odsječka *RHD* mora biti u smjeru 5' od te pozicije. Po drugoj hipotezi, koja je manje vjerojatna, odsječak *RHD* u hibridnom alelu potječe od iznimno rijetkog alela *RHD\*01.01* koji sadrži SNV c.48G>C. Kako je taj SNV jednak i u alelu *RHCE\*02* (*\*Ce*), 3'-kraj odsječka *RHD* tada mora biti u neodređenoj poziciji u intronu 1 na koji su vezane početnice amplikona i na koji se veže proba *RHCE* c.48G>C, jer je i ona pozitivna u uzorku ispitanika, a specifična je za *RHCE*.

Najvjerojatnija ograničenja sekvence *RHD* u hibridnom alelu *RHCE* ispitanika stoga su:

- 5'-kraj: pozicija 5' od c.-132 u 5'UTR, 3' od uzvodnog Rh-okvira
- 3'-kraj: pozicija 5' od c.48 u egzonu 1.

Kao najizgledniji podskup svih sekvenci koje zadovoljavaju ta ograničenja te najjednostavnije objašnjenje svih dobivenih molekularnih rezultata, čini se upravo kalupna promjena jedne baze (SNV) u 5'UTR alela *RHCE\*02*, c.-132G>A (Slika 38).



**Slika 38.** Hipoteza o smještaju sekvence *RHD* unutar gena *RHCE* u ispitanika s hibridnim alelom strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*. Plavo su sekvence koje potječu iz gena *RHCE*, a crveno iz gena *RHD*. (A) moguća sekvenca *RHD* na temelju rezultata istraživanja, (B) najizglednija mogućnost (hipoteza).

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se povezao molekularni mehanizam nastanka ovog alela s rezultatima testa adsorpcije i elucije u ovom istraživanju, prije svega konačno definiranje strukture alela i određivanje svih intronskih i egzonskih polimorfizama, najbolje metodama NGS. Ako se prihvati hipoteza o polimorfizmu jedne baze u 5'UTR, postoje istraživanja koja su pokazala vezu između polimorfizama u 5'UTR i promijenjene ekspresije proteina [225]. Izgleda da je ovaj pretpostavljeni polimorfizam u 5'UTR, inače karakterističan u alelima *RHD*, mogao utjecati na promjenu strukture proteina RhCE kao produkta hibridnog alela, tako da su se formirali epitop ili epitopi RhD, što je u inverznoj situaciji zaključak i za različite D-varijante [73]. To bi moglo biti potencijalno objašnjenje kako su se protutijela anti-D u testu adsorpcije i elucije vezala na produkt hibridnog alela u ovom istraživanju. Na valjanost hipoteze da je struktura proteina RhCE u ovog ispitanika promijenjena ukazuje ponajviše rezultat negativne kontrole u testu adsorpcije i elucije. Eritrociti negativne kontrole imali su jednaki Rh-fenotip dCcee, kao što je serološki određeno i u uzorku s ovim hibridnim alelom. Za razliku od produkta hibridnog alela, kontrolni eritrociti nisu adsorbirali protutijela anti-D jer nisu identificirana u eluatu. Iz toga proizlazi da je struktura proteina RhCE u ispitanika nastalog kao produkta hibridnog alela *RHCE* morala biti različita od produkta nepromijenjenog alela *RHCE\*02*, oba s jednakim Rh-fenotipom dCcee. Brojni su primjeri alela *RHD* čiji su produkti antigeni D DEL fenotipa, pa i u ovom istraživanju (*RHD\*DEL44*). Oni se ne mogu rutinski otkriti serološkim metodama, a fenotipski pokazuju epitope RhD dokazane testom adsorpcije i elucije. Postoji analogija između takvih situacija i seroloških rezultata uzorka s hibridnim alelom na lokusu *RHCE* u ovom istraživanju.

Na kraju rasprave o ovom hibridnom alelu potrebno se kratko osvrnuti na njegov naziv. Alel još nije definiran u službenom popisu alela ISBT-a zbog određenih nedorečenosti i proturječnosti u dosadašnjim opisima [87,221-223]. Zbog toga se zasad može opisivati samo strukturom hibridnog alela. Kad i ako alel te strukture bude prihvaćen, i dobije službeni naziv ISBT-a, službena nomenklatura same strukture najvjerojatnije će ipak biti *RHCE\*D(1)-CE*. Razlog tomu leži u uobičajenoj nomenklaturi hibridnih alela, koja nalaže da se brojkom označavaju egzoni umetnutog odsječka koji potječe od drugog paraloga. To se može usporediti s alelom *RHD\*DEL44*, čija se struktura označava s *RHD\*D-CE(4-9)-D*. U pisanju disertacije pojavila se dvojba kako označavati strukturu pronađene varijante gena *RHCE*, pogotovo zbog prikazane rasprave i potencijalne promjene jedne baze (SNV) u 5'UTR. Radi usklađenosti s literaturom, za glavni naziv

strukture alela u disertaciji odabran je ipak *RHCE\*D-CE(2-10)* jer je tako do sada opisan u svim radovima. Vjerojatno je to zato što su aleli određivani reagensima za *RHD*, pa se najprije čak smatrao i alelom *RHD* u koji bi odsječak *RHCE* bio umetnut [221]. Za tako oblikovani alel *RHD* nomenklatura s „*CE(2-10)*“ bila bi opravdana. U ovoj situaciji, kad se dokazano radi o alelu na lokusu *RHCE*, nije umetnut odsječak „*CE(2-10)*“, već odsječak „*D(1)*“. Baza alela RHeference navodi i precizniji prikaz strukture alela, *RHCE\*D(1)-CE* [76]. Kakva će biti konačna službena nomenklatura ISBT-a za ovaj alel, a ne za njegovu strukturu, nije moguće predvidjeti u ovom trenutku. Rezultati ovog istraživanja i ova rasprava nedvojbeno upućuju na to, da se radi o podtipu unutar skupine alela *RHCE\*02* (*\*Ce*), pa bi službeni naziv alela morao biti oblika *RHCE\*02.XY*.

### 5.3. Usporedba rezultata istraživanja s drugim populacijama

Molekularnim testiranjem polimorfizama gena *RHCE* nisu dobiveni rezultati različiti od serološkog određivanja antigena C, c, E i e, što je bilo očekivano. Upotrebljavani reagensi određuju polimorfizme odgovorne za ekspresiju tih antigena, uz još neke dodatne koji su produkt alela *RHCE* rijetkih u populacijama europskog porijekla [76].

U ovom istraživanju dokazana su četiri genotipa na lokusu *RHCE* te još jedan genotip koji je pretpostavljen na temelju učestalosti haplotipova (*Ce/cE* u fenotipu ispitanika *CcEe*). Od tih pet genotipova u ovom istraživanju četiri su navedena u Tablici 3 s učestalošću u općoj populaciji davatelja krvi većom od 0,01 %. Pronađen je jedan uzorak fenotipa *dCCee*. S obzirom na relativnu rijetkost da su antigeni C kodirani s oba alela lokusa *RHCE*, ispitanik tog fenotipa imao je *a priori* veću vjerojatnost za prisutnost nekog alela na lokusu *RHD*. Međutim, tom je ispitaniku ipak potvrđena delecija *RHD*. Ostali genotipovi *RHCE*, očekivano, nisu bili dokazani, jer su iznimno rijetki.

Učestalost alela *RHD* odgovornih za serološki RhD negativan rezultat je niska i vrlo različita između različitih populacija. Njihova učestalost u populacijama manja je od 1 %. Unutar skupine serološki RhD negativnih davatelja krvi učestalost varijanti gena *RHD* najmanja je u populacijama europskog porijekla, nešto je veća u populacijama afričkog porijekla, a najveća u populacijama azijskog porijekla. Kako je opća učestalost RhD negativnog fenotipa u obrnutoj proporcionalnosti (najveća u populacijama europskog, a najmanja u onima azijskog porijekla), učestalost varijanti gena *RHD* u RhD negativnim

fenotipovima u svim je populacijama otprilike slična i manja od 1 %. S obzirom na takvu očekivanu učestalost alela *RHD*, na ukupno relativno malu populaciju davatelja krvi u usporedbi s ostalim istraživanjima te na neospornu etničku homogenost stanovništva dviju županija [226], istraživanje je *a priori* imalo značajan potencijal biti neuspješno. No, nedvojbeno su utvrđeni aleli *RHD* u RhD negativnih davatelja krvi i u takvoj populaciji, s usporedivom učestalošću u populacijama Europe [46,89,150,176,177].

U ovom je istraživanju učestalost alela *RHD* te posljedično i učestalost ispitanika s alelom *RHD* u ispitanika s fenotipom ccee bila 0,00 %. U ispitanika s ostalim fenotipovima (C+ i/ili E+) učestalost alela *RHD* bila je 0,87 %, a učestalost ispitanika s alelom *RHD* 1,74 %. Svi aleli *RHD* pronađeni u ovom istraživanju bili su u skupini ispitanika C+ i/ili E+ (115/704, 16,34 %), što se i očekivalo, jer je utvrđeno da se najviše varijanti gena *RHD* može odrediti u osoba s antigenima C i/ili E [87]. Svi su bili u ispitanika fenotipa Ccee (ukupno 87/704, 12,36 % svih ispitanika). U najvećoj skupini ispitanika fenotipa ccee (589/704, 83,66 %) nije pronađen alel *RHD*, u skladu s očekivanjima.

Jedno od većih istraživanja prisutnosti alela *RHD* u uzorcima Rh-fenotipa dccee bilo je ono Gowland i sur. 2014. godine, koje je bilo ključno u donošenju odluke o obaveznom molekularnom testiranju lokusa *RHD* svih serološki RhD negativnih uzoraka u Švicarskoj [149]. Iako nije eksplicitno navedena učestalost alela *RHD* u uzorcima fenotipa dccee, ona se može izračunati iz predočenih podataka te je učestalost ispitanika s alelom *RHD* u uzorcima fenotipa dccee bila 0,028 %. U austrijskom istraživanju Polin i sur. iz 2009. godine učestalost ispitanika s alelom *RHD* u uzorcima fenotipa dccee bila je razmjerno visokih 0,15 % [176]. Usporedbom učestalošću u tom istraživanju i one u radu švicarskih autora [149], dobiva se statistički značajna razlika ( $\chi^2 = 14.683$ ,  $P < 0,05$ , s jednim stupnjem slobode). U austrijskom istraživanju određena je razmjerno velika učestalost alela *RHD\*09.05 (RHD\*weak D type 4.3)*, koji dolazi u haplotipu s *RHCE\*01*. Kasnija istraživanja potvrdila su, da je taj alel *RHD* gotovo specifičan za područje Gornje Austrije. Isključe li se iz izračuna ti uzroci, dobije se učestalost ispitanika s alelom *RHD* u uzorcima fenotipa dccee 0,014 %, što je usporedivo sa švicarskim istraživanjem bez statistički značajne razlike ( $\chi^2 = 1.041$ ,  $P = 0,308$ , s jednim stupnjem slobode). S obzirom na tako nisku učestalost opisanu u literaturi, nije se očekivalo da bi se u ispitivanoj populaciji od 589 ispitanika fenotipa ccee mogli odrediti aleli *RHD*. Preslika li se doslovno švicarska učestalost 0,028 % [149], to bi značilo da je od 589 ispitanika fenotipa ccee alel *RHD* trebalo pronaći u 0,16 ispitanika, što nije bilo realistično.



S obzirom na učestalost alela u ispitivanoj populaciji, očekivano je najveća učestalost haplotipa *dce* (91,62 %), kao i genotipa *dce/dce* (83,66 %). Prema ranije opisanim usporedbama učestalosti alela koji čine haplotipove i genotipove, pronađeni haplotipovi i genotipovi usporedivi su s europskim populacijama. Potrebno se osvrnuti na haplotipove i genotipove s dva DEL alela *RHD* pronađena u ovom istraživanju. Uobičajen postupak u transfuzijskoj medicini jest utvrditi haplotip i genotip iz fenotipa ispitanika. Uzorcima s alelima *RHD* u ovom istraživanju dokazan je fenotip DCcee te je pretpostavljen genotip DCe/dce. Ovaj fenotip nastaje kao rezultat triju mogućih genotipova koji ga kodiraju (Tablica 3, genotipovi rednih brojeva 9, 10 i 11). Ispitanici su u ovom istraživanju hemizigoti za lokus *RHD* pa nije moguće da je genotip tih ispitanika *DCe/Dce*, bez obzira na učestalost tog genotipa veću od 1 %. Od dvije preostale mogućnosti, genotip *DCe/dce* ima više od 650 puta veću učestalost od iznimno rijetkog genotipa *Dce/dCe*. Zbog toga je utvrđen pretpostavljeni genotip tih dvaju ispitanika kao DCe/dce.

U Hrvatskoj se testiranje gena sustava Rh provodi dulje od jednog desetljeća. Objavljena su populacijska istraživanja molekularnog određivanja alela slabih antigena D (Đogić i sur.) [74], određivanja DEL fenotipa u Dalmaciji (Dajak i sur.) [90] te alela *RHD* u kliničkim uzorcima (Gojčeta i sur.) [227]. Safić Stanić i sur. [91] 2020. godine objavili su istraživanje u populaciji RhD negativnih davatelja krvi središnje Hrvatske koje se metodološki razlikuje od ovog istraživanja. U ovom istraživanju svi su uzorci ispitanika, serološki RhD negativnih davatelja krvi, testirani pojedinačno molekularnim probirnim testom za *RHD*. U istraživanju [91] početni probir napravljen je u početnoj mješavini (engl. *pool*) od 20 uzoraka. U slučaju pozitivnog rezultata ponovno se testiralo pet mješavina s po četiri uzorka, te naposljetku pojedinačno četiri uzorka iz eventualno pozitivnih mješavina.

Ovo istraživanje prvo je koje je pokazalo prisutnost DEL alela i u hrvatskoj populaciji. Do sada je u nekoliko istraživanja hrvatskih autora dokazano nekoliko različitih antigena D DEL fenotipa [90,91]. Međutim, nijedan primjer DEL fenotipa nije bio kodiran DEL alelom, već drugim alelima koji pripadaju ostalim grupama alela *RHD*. U istraživanju Dajak i sur. [90] određen je DEL fenotip kodiran alelom *RHD\*11*, a u istraživanju Safić Stanić i sur. [91] DEL fenotip posljedica je ekspresije nekoliko alela koji ne pripadaju grupi DEL alela *RHD* (*RHD\*11*, *RHD\*01W.2*, *RHD\*01W.28* i alel strukture *RHD\*1027delT*).

Ovim istraživanjem prvi put je u Hrvatskoj dokazana varijanta na lokusu *RHCE*, hibridni alel strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*. Do ovog istraživanja nije bilo autora u Hrvatskoj koji bi istraživali i prikazali polimorfizam lokusa *RHCE* na molekularnoj razini (osim alela za klinički najvažnije antigene C, c, E, e). Ovo istraživanje pokazatelj je da i u hrvatskoj populaciji postoji određena varijabilnost na lokusu *RHCE* koju je potrebno detaljnije istražiti jer bi se mogla pokazati klinički važnom.

Najranije slično istraživanje u susjednim državama bilo je iz Slovenije, sa suradnicima većinom iz srednje Europe [87]. Istraživanje alela *RHD* u davatelja krvi iz Italije (Udine) objavljeno je 2011. godine [228]. Prvo istraživanje populacija RhD negativnih davatelja krvi iz Bosne i Hercegovine te Srbije objavljeno je 2019. godine [92].

#### **5.4. Razrada algoritma molekularnog određivanja alela sustava Rh u davatelja krvi u Hrvatskoj**

Prema rezultatima ovog istraživanja te argumentima iznesenim u raspravi očito je da molekularna dijagnostika u području imunohematološkog testiranja postaje nužnost. Danas postoje brojni molekularni testovi, koji se mogu izabrati ovisno o uzorku (davatelji krvi, pacijenti, trudnice), populaciji, potrebama ustanove i sl. Odluka o odabiru pojedinih testova može se temeljiti na odabiru odgovarajućeg algoritma za testiranje. Pri testiranju pacijenata potrebno je utvrditi da smiju primiti RhD pozitivan pripravak, odnosno da trudnica ne treba primiti imunoglobulin. Testiranjem davatelja krvi potrebno je osigurati, što je više praktično moguće, da krvni pripravci RhD negativnih davatelja stvarno i jesu RhD negativni, kako ne bi potencijalno imunizirali RhD negativnog primatelja.

Brojna istraživanja pokazala su da se najveći broj varijanti gena *RHD* dokazanih u serološki RhD negativnih davatelja krvi nalazi u C- i/ili E-pozitivnih osoba (onih s barem jednim alelom lokusa *RHCE* različitim od *RHCE\*01*) [87]. Imunohematološke metode ne mogu dokazati određeni broj D-varijanti [87,229]. S obzirom na dokumentiranu nesavršenost seroloških metoda, postoje različiti algoritmi za testiranje RhD. I rezultati ovog istraživanja pokazuju, da je u DNA u 3/704 (0,43 %) RhD negativnih ispitanika u direktnoj aglutinaciji i unatoč negativnom rezultatu u IAT-u prisutna određena sekvenca gena *RHD*. Testom adsorpcije i elucije potvrđena je i prisutnost antigena D DEL fenotipa, odnosno prisutnost epitopa RhD u membrani eritrocita hibridnog alela na lokusu *RHCE*.

Algoritam uvođenja molekularnog testiranja davatelja krvi koji je predložen (Slika 34) temelji se na planu ovog istraživanja i njegovim rezultatima. Bilo bi moguće napraviti i algoritam u kojem bi se svim davateljima krvi s reaktivnošću testa direktne aglutinacije  $\leq 2+$  početno napravio probirni test. I tako bi se u većini slučajeva otkrila (naslutila) varijanta *RHD* u uzorku pozitivnom na probirnom testu. Međutim, prema rezultatima ovog istraživanja, na taj način ne bi mogao biti otkriven hibridni alel na lokusu *RHCE* strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* koji ima dokazanu ekspresiju epitopa RhD. Taj hibridni alel nema egzone 3, 5 ni 10 iz gena *RHD* pa bi u probirnom testu reagirao negativno. Stoga je predložen algoritam, kao direktna posljedica rezultata ovog istraživanja, bolje rješenje, kako bi se još više smanjila mogućnost lažno negativnih rezultata.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da bi uvođenje molekularnog određivanja alela sustava Rh u serološki RhD negativnih davatelja prema predloženom algoritmu doprinijelo povećanju sigurnosti primjene krvnih pripravaka. Slično je još 2013. godine napravljeno u Švicarskoj, otkad je u cijeloj državi obavezno molekularno testiranje svih serološki RhD negativnih davatelja krvi [149,150]. Slično se radi u nizu država na razini transfuzijskih centara, poput Njemačke [89,210], Austrije [87,176], Brazila [175] ili SAD-a [233]. Davatelji krvi koji su na probirnom testu pozitivni za *RHD*, mogu se dostupnim testovima dalje testirati, radi utvrđivanja detaljne molekularne osnove pozitivnog probirnog testa.

Algoritmom se predlaže ponoviti testiranje u drugom davanju krvi istog davatelja. Time bi se smanjila mogućnost utjecaja administrativnih pogrešaka na pohranjene rezultate u informacijskom sustavu (ljudska greška pri testiranju, pogrešno označen uzorak i sl.). Dugoročno, samo bi se novi davatelji krvi trebali testirati probirnim ili testom za proširenu tipizaciju alela sustava Rh i to samo pri prvom i drugom davanju krvi.

DNA testiranje nije potrebno raditi svaki put kad se određuje krvna grupa davatelja krvi, odnosno, ako se proširi doseg ovog algoritma, pacijenta ili trudnice. S obzirom na dostupna informatička rješenja, rezultat takva testiranja uvijek može biti pohranjen u bazi medicinskih podataka. Kada ta osoba iznova dođe na davanje krvi, odnosno za vrijeme ponovnog medicinskog pregleda pacijenta ili u trudnoći, ta informacija bit će u sustavu, što će riješiti eventualne nejasne serološke rezultate. Ključan ograničavajući faktor danas je ipak logističke prirode te se svodi na prisutnost informatičkih tehnologija u medicinskim ustanovama i njihovu međusobnu umreženost.

Danas, početkom 2022. godine, u Hrvatskoj se molekularna dijagnostika alela krvnih grupa provodi u Zagrebu ponajprije za davatelje krvi i trudnice u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM) te za testiranje pacijenata i trudnica u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, a izvan Zagreba prvenstveno za testiranje pacijenata i trudnica, ali i davatelja krvi u svim Kliničkim bolničkim centrima (Osijek, Rijeka, Split).

U Hrvatskoj su u 2020. godini prikupljene 171 734 doze pune krvi, od toga 10 432 u Općoj bolnici Varaždin [230]. Prema nacionalnom sustavu za transfuzijsku medicinu ta je brojka otprilike dvostruko veća od broja davatelja krvi. Radi aproksimacija u nastavku teksta može se pretpostaviti da danas u Hrvatskoj godišnje daruje krv oko 80 000 davatelja krvi. Ta brojka varira, neki davatelji prestaju davati krv jer premašuju dob potrebnu za davatelje krvi, novi davatelji dolaze, neki daruju krv samo jednom ili povremeno itd. Kad se rezultati ovog istraživanja približno preslikaju na Hrvatsku (ne u statističkom i strogo znanstvenom smislu jer populacije nisu provjereno ekvivalentne, već za potrebe izračuna), dobivaju se sljedeći podaci. Najviše 16 000 davatelja (20 %) bilo bi RhD negativno (u ovom istraživanju 19,7 %). Među njima, najviše 20 % imalo bi antigene C i/ili E (u ovom istraživanju 16,62 %), što je najviše 3 200 davatelja. U ovom istraživanju učestalost ispitanika s alelom *RHD* u skupini svih RhD negativnih davatelja krvi bila je 0,28 %, pri čemu je gornja granica 95 %-tnog intervala pouzdanosti 1 : 97 ili 1,03 %. Uz aproksimaciju od čak 1,25 % takvih davatelja, radi se o broju od oko najviše 200 RhD negativnih davatelja krvi s nekom varijantom gena *RHD*. Krvni pripravci tih dvjestotinjak davatelja krvi danas su u Hrvatskoj potencijalni izvor imunizacije pacijenata koji ih primaju u transfuzijskom liječenju. Primjenom predloženog algoritma testiranja njihovi krvni pripravci mogu se pravilno primijeniti za liječenje RhD pozitivnih osoba te izbjeći potencijalna imunizacija RhD negativnih osoba.

Testiranje davatelja na gore opisani način potrebno je napraviti u prvoj godini uvođenja molekularnog probira. U kasnijim godinama testirali bi se samo novi davatelji krvi. Udio novih davatelja krvi u Hrvatskoj bio je u 2017. godini 7,65 %, u 2018. godini 6,78 % te u 2019. godini 6,17 % [231,232]. Radi jednostavnijeg izračuna pretpostavit će se udio novih davatelja od 10 %. Prema tomu, broj novih davatelja godišnje bio bi 8 000, od kojih bi najviše 1 600 bilo RhD negativno, a najviše 320 imalo bi antigene C i/ili E. Uz gornji izračun, godišnje bi najviše 20 (1,25 % RhD negativnih) novih serološki RhD negativnih davatelja krvi imalo alel *RHD*. Smanji li se, jednostavnosti radi, broj radnih dana godišnje na 200, uz testiranje novih davatelja dvaput prema algoritmu (prvo i drugo davanje krvi),

to bi podrazumijevalo prosječno 16 uzoraka dnevno za probirni test na *RHD* (dvije serije qPCR) te prosječno oko 3 uzorka dnevno za test koji određuje proširenu tipizaciju gena sustava Rh (tri serije qPCR). Uz testove upotrebljavane u ovom istraživanju te uz navedene vrlo široke aproksimacije navise, rezultati molekularnog testiranja alela sustava Rh u uzorcima svih davatelja krvi u Hrvatskoj u prosjeku mogu biti napravljeni na jednom uređaju qPCR unutar jedne smjene svakog radnog dana, uz vrijeme zauzetosti jedne osobe (engl. *hands-on time*) od prosječno 1 do 1,5 h dnevno.

Logistika za ovaj projekt u Hrvatskoj već je u velikoj mjeri u funkciji. U svim regionalnim kliničkim bolničkim centrima dostupna je tehnologija molekularnog testiranja, a svi centri rutinski serološki testiraju uzorke davatelja krvi na antigene sustava ABO i RhD. Potrebna je samo odluka zdravstvenih vlasti da se uvede molekularno testiranje za alele sustava Rh. Alternativno rješenje predstavlja objedinjeno testiranje u HZTM-u slanjem dodatnog uzorka krvi, budući da se uzorci davatelja krvi iz cijele Hrvatske već sada svakodnevno šalju u HZTM na obavezno NAT testiranje (engl. *nucleic acid testing*) za krvlju prenosive bolesti, konkretno na viruse HIV, HCV i HBV, što je propisano Pravilnikom o osiguranju kvalitete krvi i krvnih pripravaka u zdravstvenim ustanovama, NN91/19, čl. 19 [153].

## 5.5. Suvremena praktična primjena molekularnih metoda u sustavu Rh

### 5.5.1. Predviđanje fenotipa RhD iz DNA

Kao krovno svjetsko udruženje u transfuzijskoj medicini ISBT izričito zahtijeva precizne pojmove u rezultatima testiranja. Zbog raznovrsnih načina na koji jedan genetički događaj može utjecati na konačni protein, odnosno fenotip, u molekularnoj dijagnostici potrebno je navesti izraze poput *vjerojatni* genotip ili *predviđeni* fenotip ili *pretpostavljeni* haplotip (slijedom engl. *probable, predicted, assumed*). Molekularnim testovima radi se „samo“ s DNA iz uzoraka, ali barem u teoriji, do antigena ili nepostojanja ekspresije postoji još nekoliko procesa (transkripcijskih, posttranskripcijskih, translacijskih, posttranslacijskih) kojima potencijalno nije proučen mehanizam ili u konačnici nisu testirani usporedno s istraživanom DNA.

Danas postoje komercijalni proizvodi za određivanje većine alela za klinički važne D-varijante [234]. S visokom preciznosti moguće je predvidjeti fenotip RhD testiranjem DNA neke osobe. RhD negativan fenotip, barem u populacijama europskog porijekla, većinom je posljedica homozigotnosti za deleciju *RHD*. Zato se amplificiranjem neke regije gena *RHD* može najjednostavnije odrediti postoji li gen u uzorku, i to početnicama za amplifikaciju samo gena *RHD* zbog velike homologije sekvenci gena *RHD* i *RHCE*. Regije s razlikama u sekvenci između dva gena jesu egzoni 3, 5 i 7, regija 3' UTR nakon egzona 10 (sekvenca u genu *RHD* koja ne postoji u genu *RHCE*) te intron 4 sa 600 pb u genu *RHD*, a 1200 pb u genu *RHCE* [14,60]. Probirni test za *RHD* u ovom istraživanju bio je upravo takav, egzoni 3, 5 i 10 *RHD*, pri čemu početnice odgovorne za egzon 10 imaju početnu poziciju u regiji 3'UTR sa specifičnom sekvencom baš za gen *RHD*. Uvijek se moraju testirati barem dvije regije gena, kako bi se spriječili lažni rezultati u hibridnih alela strukture *RHD-CE-D*. Radi globalne primjene, svaki molekularni set za testiranje trebao bi moći odrediti i *RHD\*Ψ*, alel RhD negativnog fenotipa koji je relativno čest u populacijama afričkog porijekla [94].

### 5.5.2. Određivanje *RHD* iz fetalne DNA

Klinički je važno predvidjeti fenotip RhD iz DNA fetusa RhD negativne žene s protutijelima anti-D. Ako je fetus D-pozitivan, postoji rizik od HBFN-a, što je značajna informacija i za transfuziološku i ginekološku struku. Ako je fetus D-negativan, nije rizičan i nije potrebna daljnja aktivnost. Kad je molekularna osnova RhD negativnog fenotipa prvi put određena, fetalna DNA uzimala se aminocentezom ili iz uzorka korionske resice, invazivnim postupcima značajno rizičnim za fetus. Nakon otkrića cffDNA u krvi trudnice [235], cffDNA je postala prioritetan izvor fetalne DNA u D-negativne trudnice [236].

Određivanje fetalnog *RHD* u aloimuniziranih žena danas je rutinski postupak u mnogim državama, posebno u Europi. Metoda je obično qPCR usmjeren na egzon 4 *RHD* (koji daje negativan rezultat s *RHD\*Ψ*), egzon 5 ili 7 te egzon 10 *RHD*, pa se mogu odrediti i hibridni aleli strukture *RHD-CE-D* [237,238]. Ako koji od tih egzona pokaže reaktivnost, alel *RHD* može se utvrditi sveobuhvatnim testom za proširenu tipizaciju alela sustava Rh koji je upotrebljavan i u ovom istraživanju. U mnogim državama pravilo je da se trudnicama oko 28. do 34. gestacijskog tjedna ponudi imunoglobulin anti-D za sprečavanje prenatalne imunizacije. Od 11. gestacijskog tjedna visokoprotodne metode

za određivanje fetalnog *RHD* točne su te je moguće odrediti fetalni *RHD* u svih RhD negativnih žena [239-242]. Probir za fetalni *RHD* uveden je u rutinsku praksu, na primjer u Danskoj [243], Nizozemskoj [244] i Norveškoj [245], a testiranje je dostupno i u Hrvatskoj [246].

Glavna prednost provođenja probira za fetalni *RHD* jest ta što se trudnice ne moraju izlagati krvnim pripravcima i povezanim neugodnostima, nelagodi te, iako zanemarivim, potencijalnim rizicima infekcija zbog injekcija imunoglobulina. Probir za fetalni *RHD* omogućuje značajno smanjenje količine krvnih pripravaka koji se rutinski daju trudnicama. Analize troškova i koristi pokazuju uštedu jer je trošak testiranja znatno manji od troška potrebnog imunoglobulina anti-D. Posebnu vrijednost test ima kad se napravi rano u trudnoći i time spriječi nepotrebne injekcije protutijela anti-D iza kojih mogu slijediti imunizacijski događaji poput traume ili prijetećeg pobačaja [243].

### 5.5.3. Test za određivanje zigotnosti lokusa *RHD*

Ako RhD negativna trudnica ima protutijelo anti-D, korisno je znati zigotnost oca djeteta za lokus *RHD* zbog predviđanja fetalnog fenotipa RhD. Ako je otac djeteta homozigot za lokus *RHD*, dijete će gotovo sigurno biti D-pozitivno i nije potrebno testiranje fetusa. Ako je otac djeteta hemizigot za lokus *RHD*, postoji jednaka vjerojatnost za D-pozitivan ili D-negativan fetus. Predviđanje zigotnosti *RHD* iz serološki pretpostavljenih genotipova nije prikladno jer postoje jednostavni molekularni testovi. Identifikacija sekvence mjesta prekida unutar uzvodnog i nizvodnog Rh-okvira, čime u RhD negativnom haplotipu delecijom *RHD* nastaje hibridni Rh-okvir, omogućila je test za zigotnost *RHD* metodom PCR. Njime se direktno određuje haplotip s delecijom *RHD*, bilo početnicama ovisnima o sekvenci, kao u ovom istraživanju (PCR-SSP) [44] ili restrikcijskom endonukleazom *Psf* I [247]. Taj je princip prikladan za testiranja u populacijama europskog porijekla u kojima je delecija *RHD* u golemoj većini uzrok RhD negativnog fenotipa. Nešto je manje precizan u osoba afričkog porijekla gdje postoje značajnije razlike između sekvenci uzvodnog i nizvodnog Rh-okvira [166]. Globalno stoga veći potencijal primjene za određivanje zigotnosti *RHD* ima metoda qPCR, kojom se broj kopija gena *RHD* može usporediti s nekim genom poznate zigotnosti poput gena *RHCE* [248].

## 5.6. Izazovi i budućnost određivanja alela sustava Rh

### 5.6.1. Baze sekvenci i alela sustava Rh

Jedan od najvećih izazova populacijskih istraživanja u sustavu Rh neprestano je otkrivanje novih alela, zbog čega treba nadopunjavati i proširivati već obrađene populacije. Populacijska istraživanja omogućuju stvaranje baza podataka s informacijama o strukturi alela, ekspresiji, haplotipu unutar kojeg je pronađen, fenotipu uzorka, o tome je li pronađeno protutijelo usmjereno na antigen i sl. Za brojne populacije u svijetu nema podataka o populacijskim istraživanjima, a za neke populacije ili alele dostupni su podaci nepotpuni [60,76]. Važnost svakog objavljenog populacijskog istraživanja ovakve vrste očituje se ponajprije u obogaćivanju baza alela podacima o pojedinim varijantama gena *RHD* i *RHCE* kojih je danas službeno više od 600 [11,13]. Dugo je značajna *online* baza alela gena *RHD* bila The Human Rhesusbase [60]. Još opsežnija *online* referentna baza alela RHeference objavljena je u travnju 2021. godine i opisuje polimorfizme alela *RHD*, njihovu ekspresiju i kliničke implikacije [76]. Doprinos toj bazi alela svojim je istraživanjem dao i autor ove disertacije [92].

Problem u radu s bazama alela jest nepostojanje rasporeda ažuriranja baza. Baza alela HLA, na primjer, ažurira se četiri puta godišnje [16]. Ne postoji ni centralizirano mjesto za pohranu sekvenci novootkrivenih alela, ni novih strukturnih, haplotipskih ili funkcionalnih obilježja ranije otkrivenih alela. Radna skupina ISBT-a morat će standardizirati te postupke za olakšavanje istraživanja i dijagnostike.

Velika teškoća u istraživanju alela sustava Rh nedovoljna je uređenost podataka u samim bazama sekvenci i bazama alela Rh. Tek je 28. studenog 2021. godine u bazi sekvenci GenBank [14], kao referentna sekvenca gena *RHD* upisana sekvenca alela *RHD\*01* za standardni antigen D, umjesto alela *RHD\*10.00* iz skupine vrlo rijetkih DAU-alela, najčešćih u populacijama afričkog porijekla [98]. Podatak da je donedavno netočan alel bio naveden kao referentan, nerijetko je zbunjivao stručnu javnost, no kako je bio poznat, nije dolazilo do pogrešaka u istraživanjima i objavljenim radovima. Godinama se sekvenca nije popravljala, no to je konačno riješeno na temelju istraživanja Tounsi i sur. te teksta u uvodu rada Fichou i sur. [208, 249]. U raspravi ovdje opisan je i primjer neodgovarajuće literature za alel strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* u bazi RHeference, koja nudi opis paralognog alela inverzne strukture *RHD\*CE-D(2-10)* ili *RHD\*01.01* [76].



### 5.6.2. Primjena sekvenciranja sljedeće generacije za alele sustava Rh

Izniman porast broja otkrivenih alela HLA posljednjih godina posljedica je testiranja sve većeg broja uzoraka metodama NGS, koje sve više postaju rutinske dijagnostičke metode, što je situacija i u Hrvatskoj [250,251]. Sve je više i istraživanja alela različitih sustava krvnih grupa metodama NGS, pa tako i sustava Rh. Moguće je odrediti sekvence introna i regija UTR, koji mogu značajno utjecati na ekspresiju pojedinog alela [211,225], što nije moguće testirati u rutini metodama qPCR, PCR-SSP ili PCR-SSO. Osim testiranja kodirajućih regija (egzona) danas najčešćim metodama, time bi se mogla utvrditi važnost intronskih polimorfizama za ekspresiju pojedinih alela. I ovo istraživanje (c.149-29G>C, *RHD\*DEL32*) naglašava isti stav o važnosti intronskih polimorfizama za promjene u ekspresiji alela. To će prilično obogatiti populacijska istraživanja jer se dosadašnjim pristupom uz danas najčešće molekularne metode pri rutinskom testiranju većina sljedova nukleotida gena sustava Rh ne dokazuje. Dokazuju se samo pojedinačni polimorfizmi te je danas nemoguće jednim rutinskim testom otkriti sve polimorfizme u sekvenci gena.

Glavni biološki izazovi rutinskog testiranja metodama NGS alela sustava Rh jesu izrazita homologija gena *RHD* i *RHCE* te mogućnost nastanka hibridnih alela. Trenutno se fokus istraživanja svodi na unapređenje programskih algoritama za pravilno poravnanje sekvenci pojedinih odsječaka DNA. Odsječci veličine 150 ili 200 pb gena sustava Rh u većini su slučajeva prekratki da bi sadržavali neke diskriminatorne pozicije u sekvenci, kojima bi se pravilno definirao gen kojemu pripadaju. Kodirajuća sekvenca obaju gena duljine je po 1254 pb sa STOP kodonom, što čini oko 2 % ukupne sekvence gena. Oba gena kodiraju produkte od 417 aminokiselina, a međusobno se razlikuju u manje od 40 pb (manje od 3,2 %). Najveća gustoća polimorfizama nalazi se u egzonima 3 do 5 i 7. Sekvence egzona 8 i 10 potpuno su jednake, a u egzonima 1 i 2 također mogu biti jednake, ovisno o alelu *RHCE* u uzorku [14].

Prvo sveobuhvatno istraživanje metodom NGS u sustavima krvnih grupa bilo je autora Fichou i sur. 2014. godine [252]. Napravili su dva testa: u prvom su početnice kreirane nasumično prema ciljnoj sekvenci u odgovarajućem programu dok su u drugom hotimice, zbog smanjenja utjecaja homologije u sekvencama gena sustava Rh, napravili dvije odvojene i različito obilježene mješavine za PCR, sa specifičnim početnicama za egzone 1 i 2 *RHD* (mješavina A) i egzone 1 i 2 *RHCE* (mješavina B). Odsječci su bili veličine 200 pb te su bili poravnati prema referentnoj sekvenci u bazi sekvenci GenBank [14].

U prvom testu nisu mogli dobiti točnu sekvencu u egzonu 2 odgovornu za ekspresiju antigena C, zajedničku alelima *RHCE\*02* i *RHCE\*04*, ali i alelu *RHD\*01*. U drugom testu s početnicama specifičnim za pojedini gen, poravnanje je napravljeno točno.

Sekvenciranje alela sustava Rh zahtjevno je zbog različitih hibridnih alela struktura *RHD-CE-D* i *RHCE-D-CE* pa je interpretacija rezultata iz kratkih odsječaka u NGS-u izazovna, jer je pravilno poravnanje uz referentnu sekvencu često nejasno ili nemoguće. Na problem hibridnih sekvenci upućuje i ovo istraživanje (sekvenciranje egzona 6 i 8 alela *RHD\*DEL44*). Tomu se može doskočiti panelima početnica za ciljano sekvenciranje [212] ili odvojenim DNA knjižnicama (engl. *DNA library*) s različitim obilježavanjem (engl. *indexing*) svakog homolognog gena kako bi se mogle razlikovati njihove sekvence [252]. Ubuduće bi i aparati koji upotrebljavaju nanopore mogli sekvencirati direktno iz pune krvi bez prethodne izolacije DNA ili RNA, što bi moglo znatno pojednostavniti postupak [253]. U nastavku je opisano nekoliko istraživanja koja su se bavila rješavanjem izazova postupka i informatičke analize sekvenciranja alela Rh metodama NGS.

Schoeman i sur. ukazali su na potrebu ručne interpretacije razlika u broju kopija za točno određivanje raznih genskih rearanžmana [112]. Taj je postupak posebno važan kod hibridnih alela. U hemizigotne osobe za *RHD* s hibridnim alelom strukture *RHD-CE-D*, odsječak *RHCE* pojavljuje se tripot: jednom u hibridnom alelu na lokusu *RHD*, a dvaput u dvama alelima na lokusima *RHCE*. Ako je u homozigotne osobe za *RHD* sekvenca *RHCE* prisutna dvaput, to znači da nema hibridnog alela na lokusu *RHD* jer obje sekvence *RHCE* potječu s dvaju lokusa *RHCE* (po jedna sa svakog od homolognih kromosoma 1).

Chou i sur. kvantificirali su pogreške u određivanju slijeda nukleotida i zaključili da je nepravilno poravnanje gena u sustavu Rh bilo glavni razlog tih pogrešaka [254]. U njihovu istraživanju podudarnost rezultata s drugim metodama bila je 91,7 %, što je premalo i nije prihvatljivo iz kliničke perspektive.

Lane i sur. programirali su posebno informatičko rješenje za automatsku analizu broja kopija iz podataka u sekvenci [255], vođeni istom premisom kao i Schoeman i sur. [112]. U tom istraživanju, uz informatičku analizu broja kopija, podudarnost rezultata bila je primjetno bolja od rezultata Chou i sur. [254], te je iznosila 100 % za *RHD* i 99,5 % za alele koji kodiraju antigen C (*RHCE\*02* i *RHCE\*04*).

Wheeler i sur. napravili su prilagođeni panel za detekciju alela sustava Rh ciljanim sekvenciranjem [212] jer egzoni neposredno susjedne intronske regije imaju različite sekvence u alelima *RHD* i *RHCE* [14]. Tako se mogu dizajnirati početnice za točno poravnanje i kratkih odsječaka jako homolognih sekvenci (egzoni 1, 2 i 8). Istraživanje je provedeno u multietničkom uzorku ispitanika i točno je predvidjelo ekspresiju antigena C u 99,2 % ispitanika, što je važno za globalnu rutinsku primjenu testiranja u budućnosti.

Tounsi i sur. prvi su koristili novi pristup tzv. *long-range* PCR amplikona u metodi NGS [206]. Amplificirali su cijeli gen *RHD* (sa svim egzoni i intronskim sekvencama) *long-range* Taq polimerazom te metodom NGS (sekvenciranje cijelog genoma, WGS, engl. *whole genome sequencing*) konačno u potpunosti definirali referentni alel gena *RHD*, *RHD\*01*. Fichou i sur. sekvencirali su *long-read* pristupom, uz najnoviji princip metoda NGS-a – monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu, SMRT (engl. *single-molecule real-time*), paralelno sekvenciranje pojedinačne molekule DNA [249].

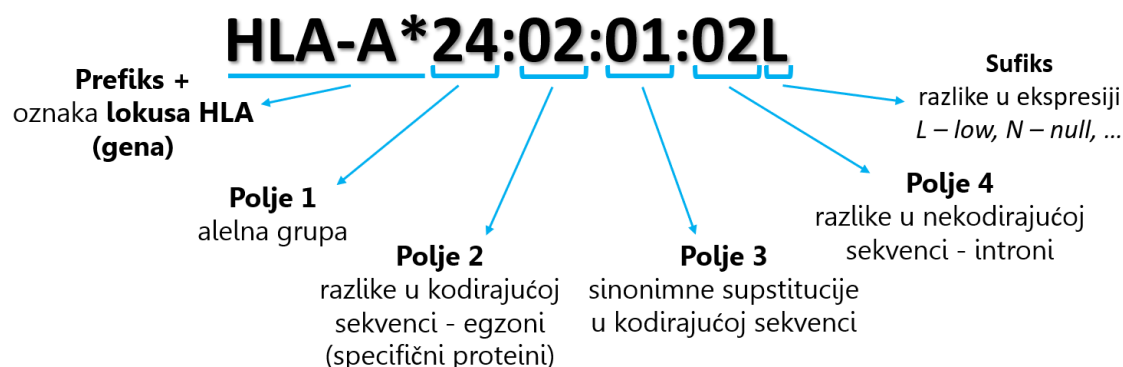
U siječnju 2022. godine objavljeno je istraživanje autora Zhang i sur. (podudarnost dijela autora s istraživanjem [254]) koji su principom SMRT sekvencirali alele sustava Rh [113]. Tim principom omogućuje se dobivanje mnogo duljih sekvenci za kasnije algoritme poravnanja u programu, što bi, u teoriji, povećalo preciznost odabira gena kojem pripada određeni odsječak. Najprije je napravljena selekcija odsječaka veličine do 20 kb, čija je sekvenca nadopunjena tehnologijom *long-read* sekvenciranja. U programu za analizu napravljen je algoritam koji sve odsječke DNA virtualno podijeli u odsječke duljine 400 pb, od kojih se 300 pb preklapa s prethodnim i sljedećim odsječkom u sekvenci. Drugi dio algoritma uključuje palindromske sekvence, inače relativno česte u genomima. Palindromska sekvenca jest ona koja je u komplementarnom lancu DNA jednaka kad se čita u istoj orijentaciji kao i izvorna. Primjer je palindromske sekvence 5'-TGCTAGCA-3' jer je sekvenca u komplementarnom lancu DNA 3'-ACGATCGT-5', koja je jednaka izvornoj čitana u smjeru 5'→3'. Upotreba palindromskih sekvenci služi rješavanju ključne razlike između metoda sekvenciranja sljedeće generacije kratkih ili duljih odsječaka DNA. Pri sekvenciranju kraćih odsječaka sekvenca je prilično točna jer je stopa pogrešaka Taq polimeraze manja od 1 %, dok je pri duljim odsječcima točnost sekvence niža, sa stopom pogrešaka Taq polimeraze 10 do 15 % [256]. No kraći odsječci teško se mogu pravilno poravnati uz dvije ili više izrazito homolognih sekvenci, poput alela sustava Rh. Palindromske sekvence u virtualnim odsječcima od 400 bp znatno su poboljšale preciznost poravnanja sekvenci s točnim genom na 99,75 do 99,9 %. [113].

Glavni izazov očekivanog velikog porasta broja alela jest utvrditi kliničku posljedicu i kliničku važnost određivanja tolikog broja različitih alela. Osnovna je uloga određivanja krvne grupe u sustavu Rh spriječiti mogućnost imunizacije RhD negativnog primatelja transfuzije krvi. S obzirom na ranije opisanu nejednoznačnu sljedivost fenotipskog obilježja antigena iz određene genske (egzonske) sekvence, to bi značilo da se za svaki novootkriveni alel mora opisati i fenotip kodiranog antigena, koji opet ne mora biti uvijek jednak. Buduća istraživanja trebala bi pokazati mogu li promjene u nekodirajućim regijama objasniti razlike u ekspresiji pojedinih alela s istim sekvencama egzona, za što su metode NGS u velikoj prednosti nad ostalim metodama. U bliskom budućem razdoblju nužan je dogovor liječnika transfuzijske medicine te stručnjaka molekularne biologije i bioinformatike o tome koje od tih rješenja može biti učinkovito primjenjeno u rutinskom testiranju. Novije tehnologije (SMRT) mogle bi sve te izazove umanjiti ili potpuno poništiti. Kombinacija *long-read* tehnologije sekvenciranja i bioinformatičkih algoritamskih rješenja mogla bi omogućiti rutinski pristup tehnologije širokoj primjeni i u molekularnoj dijagnostici zadovoljavajući visoke standarde točnosti rezultata testiranja prema zahtjevima transfuzijske medicine.

### 5.6.3. Korelacija gen → antigen u nomenklaturi alela sustava Rh

Određivanje alela za antigene krvnih grupa uzima sve veći zamah, što vrijedi posebno u sustavu Rh. Neprestano se pronalaze novi aleli, što otvara nova pitanja u vezi s njihovom prikladnom sistematizacijom. Pritom postoje brojne dodirne točke s izazovima grupiranja alela pri istraživanju sustava HLA, no u sustavima krvnih grupa postoje značajne posebnosti i razlike. Sustav HLA najpolimorfiji je sustav gena u čovjeka. Smješten je na kraćem kraku kromosoma 6. Najnovija baza alela HLA iz siječnja 2022. godine, verzije 3.47, sadrži 32 897 alela HLA [16]. Najpolimorfiji genski lokus u čovjeka jest HLA-B, s 8 756 opisanih alela. Porast broja alela primorao je Odbor za nomenklaturu faktora u sustavu HLA Svjetske zdravstvene organizacije da još 2010. godine donese nova pravila za nomenklaturu alela HLA, jer dotadašnja nomenklatura nije bila odgovarajuća za pravilno definiranje i grupiranje sve većeg broja otkrivenih alela [16].

Nomenklatura i pravila označavanja pojedinog alela HLA opisana su na Slici 39. Radna skupina za imunogenetiku eritrocita i nazivlje krvnih grupa ISBT-a prije nekog vremena postavila je sličan princip i za alele krvnih grupa.



Slika 39. Shematski prikaz osnovnih pravila nomenklature alela HLA. Izvor podataka: [16].

Današnja službena nomenklatura alela sustava Rh opisana je na Slici 10. Taj način obilježavanja nije u međuvremenu zaživio u rutinskom radu u struci, zasigurno ne (samo) zbog znanstvenog konzervativizma. Nije utvrđena izravna veza između određene genske strukture i ekspresije antigena u sustavu Rh. Konkretnije, nije utvrđena korelacija između promjena u genskoj sekvenci (bilo egzonskih i/ili intronskih polimorfizama, hibridnih alela, mutacija unutar mjesta prekrajanja i oko njih) i posljedica koje taj događaj ima na ekspresiju antigena D (hoće li biti parcijalni D, slabi D, DEL ili RhD negativan fenotip). Utvrđeno je upravo suprotno, da jednak molekularni mehanizam nastanka određenih varijanti gena može dovesti do različitih fenotipskih značajki. Primjer je alel *RHD\*DEL44*, pronađen i u ovom istraživanju, čiji je produkt bio DEL fenotipa, kao i u nekim ranijim istraživanjima u Kini [80,205,215]. Međutim, neka su druga istraživanja utvrdila da se taj alel nalazi u osobe RhD negativnog fenotipa potvrđenim negativnim rezultatom u testu adsorpcije i elucije. Taj je alel ISBT također uključio u grupu DEL alela, službene nomenklature *RHD\*01EL.44* [11]. Alel je strukture *RHD\*D-CE(4-9)-D* i pripada skupini velikih hibridnih alela, za koje se ranije pogrešno smatralo da ne mogu imati funkcionalni produkt. To je bio razlog zbog čega u Švicarskoj nisu provodili test adsorpcije i elucije za produkt tog alela u njihovom istraživanju [149]. Današnja nomenklatura alela ne otkriva je li fenotip tog alela, na primjer, DEL ili RhD negativan. Iako bi se za skupinu DEL alela moglo zaključiti da je iz nomenklature *a priori* definirana ekspresija antigena, to nije u potpunosti precizno. Podrazumijeva se da su svi DEL aleli dokazani testom adsorpcije i elucije, a da su u IAT-u bili RhD negativni u hemizigotnom uzorku za *RHD*. Velik je problem to što svi DEL aleli ne pokazuju uvijek istu ekspresiju bez iznimaka, kao što za alel *RHD\*DEL44* pokazuju primjeri istraživanja u Tablici 21.

Još jedan primjer nepostojanja korelacije između strukture gena i fenotipske ekspresije antigena je polimorfizam p.M295I u proteinu RhD. To je polimorfizam kodiran u egzonu 6 gena *RHD* (c.885G>T) s različitom ekspresijom ovisno o alelu *RHCE* s kojim se nalazi u haplotipu [60]. Varijanta je izvorno nazvana „*weak D type 11*“. Točan mehanizam nije poznat, međutim, alel ima ekspresiju fenotipa slabog D u haplotipu s *RHCE\*02* (*\*Ce*), a kodira DEL fenotip u haplotipu s *RHCE\*01* (*\*ce*). DEL fenotip vjerojatno je posljedica suprimirajućeg djelovanja C u *cis*-poziciji [46]. Dodatnu važnost te diferencijacije potvrđuje i moguća prisutnost aloprotutijela anti-D u osobe s tim alelom [257]. Zato ISBT produkt tog alela danas smatra parcijalnim antigenom D, iako je izvorno definiran kao slabi D. Nomenklatura alela s polimorfizmom c.885G>T glasi *RHD\*11* ili *RHD\*weak partial 11*, što ukazuje na njegovu slabu ekspresiju, ali i mogućnost da djeluje i kao parcijalni D stvaranjem aloprotutijela [11]. Iz naziva ipak nije jasno da se radi i o alelu koji može imati i ekspresiju DEL fenotipa [92].

U sustavu Rh danas ne postoji nomenklatura za sinonimne polimorfizme u egzonima. Mnogo je takvih polimorfizama kojima nisu pridruženi odgovarajući aleli. Za gen *RHD* u bazi alela Rhesusbase popisani su kao „SNP bez alela“ (*SNP without alleles*) [76]. Najveći broj tih polimorfizama gena *RHD* preuzet je iz baze genoma gnomAD [170]. Za njih nisu napravljena dodatna istraživanja (ekspresije antigena, određivanje fenotipa, haplotipa i sl.). Takvi sinonimni polimorfizmi svrstani su, međutim, u odgovarajuće alele HLA, kod kojih treće polje u nomenklaturi služi upravo za njihovo označavanje. U nomenklaturi alela HLA postoji sufiks N, koji se pridodaje nul-alelima bez ekspresije (kao u *HLA-C\*04:09N*), što je analogno prisutno i u nomenklaturi alela *RHD* (kao u *RHD\*01N.01*). U teoriji, sufiks A (engl. *aberrant*) trebao bi se dodavati alelima HLA ako postoji sumnja u ekspresiju alela, no zasad nijedan alel HLA ne nosi taj sufiks [16].

Brojne su posebnosti za gotovo svaku pojedinu varijantu gena sustava Rh te do sada nije utvrđen optimalni mehanizam za jednoznačno grupiranje varijanti bez (mnogo) iznimaka. Parafrazirajući latinsku izreku, *Nomen non est omen* (lat. 'Naziv nije znamen.') zasad definitivno vrijedi u slučaju nomenklature sustava Rh. Jedan od ciljeva i zadataka Radne skupine ISBT-a je definirati nomenklaturu koja će preciznije označavati fenotipske karakteristike pojedinog alela, prvenstveno gena *RHD*, zbog kliničke važnosti antigena D, ali i gena *RHCE*.

## 5.7. Usporedni prikaz rezultata istraživanja

Eksplícitno navedene sumarne rezultate ovog istraživanja unutar kategorija podataka koje zahtijevaju postojeće baze alela sustava Rh prikazuje Tablica 22 [60,76].

**Tablica 22.** Sažeti usporedni prikaz dobivenih rezultata molekularnog određivanja alela sustava Rh u populaciji RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske.

Alel	<i>RHD*DEL32</i>	<i>RHD*DEL44</i>	<i>RHCE*D-CE(2-10)</i>
Službena nomenklatura ISBT-a	<i>RHD*01EL.32</i>	<i>RHD*01EL.44</i>	Naziv (još) nije dodijeljen
Tip alela prema mehanizmu nastanka	SNV, intronski polimorfizam	Hibridni alel <i>RHD-CE-D</i>	Hibridni alel <i>RHCE-D-CE</i>
Struktura alela	c.149-29G>C prema <i>RHD*01</i>	<i>RHD*D-CE(4-9)-D</i>	<i>RHCE*D-CE(2-10)</i> <i>RHCE*D(1)-CE</i>
Učestalost alela u populaciji RhD negativnih davatelja krvi (95 %-tni interval pouzdanosti)	0,07 % 1 : 1408 (1 : 55613 – 1 : 253)	0,07 % 1 : 1408 (1 : 55613 – 1 : 253)	0,07 % 1 : 1408 (1 : 55613 – 1 : 253)
Učestalost alela u populaciji davatelja krvi fenotipa D– C/E+ (95 %-tni interval pouzdanosti)	0,43 % 1 : 230 (1 : 9084 – 1 : 41)	0,43 % 1 : 230 (1 : 9084 – 1 : 41)	0,43 % 1 : 230 (1 : 9084 – 1 : 41)
Serološki RhD, direktna aglutinacija	Negativan	Negativan	Negativan
Serološki RhD, IAT	Negativan	Negativan	Negativan
Rezultat qPCR <i>RHD</i>	Potvrđeni polimorfizmi za sve testirane egzone gena <i>RHD</i>	Potvrđeni polimorfizmi za egzone 1, 2, 3 i 10 gena <i>RHD</i>	Slaba, ali konzistentna reakcija za polimorfizam 5'UTR / egzon 1 gena <i>RHD</i>
Sekvenciranje <i>RHD</i>	Slijed nukleotida svih egzona jednak je slijedu nukleotida u alelu <i>RHD*01</i> , u intronu 1 određen je SNV c.149-29G>C	Egzoni 1, 2, 3, 10 iz <i>RHD</i> , egzoni 4, 5, 7, 9 iz <i>RHCE</i> , egzone 6 i 8 nije bilo moguće sekvencirati početnicama za <i>RHD</i>	Nije bilo moguće amplificirati uzorak početnicama za <i>RHD</i>
Test adsorpcije i elucije	Identificirana protutijela anti-D eluirana s eritrocita davatelja	Identificirana protutijela anti-D eluirana s eritrocita davatelja	Identificirana protutijela anti-D eluirana s eritrocita davatelja
Zigotnost lokusa <i>RHD</i>	Hemizigot <i>RHD*01EL.32</i> / <i>RHD*01N.01</i>	Hemizigot <i>RHD*01EL.44</i> / <i>RHD*01N.01</i>	Homozigot za deleciju <i>RHD</i> <i>RHD*01N.01</i> / <i>RHD*01N.01</i>
Rh-fenotip ispitanika	DC <sub>cee</sub>	DC <sub>cee</sub>	dC <sub>cee</sub>
Genotip ispitanika lokus <i>RHCE</i>	<i>RHCE*01</i> / <i>RHCE*02</i>	<i>RHCE*01</i> / <i>RHCE*02</i>	<i>RHCE*01</i> / <i>RHCE*02</i> ; eksperimentalno nije bilo moguće eksplicitno utvrditi koji je od tih alela modificiran u hibridni alel
Haplotip s alelom ( <i>RHD-RHCE</i> )	<i>DCe<sup>a</sup></i>	<i>DCe<sup>a</sup></i>	<i>dC<sub>var</sub>e</i> ili <i>dC<sub>var</sub>e<sup>b</sup></i>
Genotip ispitanika u sustavu Rh	DC <sub>e</sub> /dce <sup>c</sup>	DC <sub>e</sub> /dce <sup>c</sup>	<b>dC<sub>var</sub>e/dce</b> ili <b>dCe/dC<sub>var</sub>e<sup>b</sup></b>

**a** Haplotip određen na temelju učestalosti. Teoretski mogući haplotipovi u kojima se nalaze oba alela jesu *DCe* i *Dce*.

**b** C<sub>var</sub> i c<sub>var</sub> ovdje služe kao oznake za hibridni alel na lokusu *RHCE* strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*. Masno su označeni najvjerojatniji haplotip i genotip (hibridni alel kao podtip alela *RHCE\*02*).

**c** Genotip određen na temelju učestalosti haplotipova. Teoretski mogući genotipovi jesu DC<sub>e</sub>/dce i dCe/Dce.

Zaključno, i ovo je istraživanje potvrdilo da se molekularnim testiranjem u RhD negativnih davatelja krvi mogu pronaći rijetke varijante gena *RHD* s ekspresijom DEL fenotipa. PCR u stvarnom vremenu pokazao se kao iznimno brza, jednostavna i pouzdana metoda za rutinsko testiranje davatelja krvi u transfuzijskoj medicini. Po prvi put je potvrđena prisutnost epitopa RhD u ekspresiji hibridnog alela na lokusu *RHCE* u *RHD* negativnog ispitanika, strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*. Varijante gena *RHD* pronađene su u dva uzorka ispitanika (0,28 %), što je usporedivo sa sličnim rezultatima u europskim populacijama. Oba ispitanika imaju ekspresiju antigena D DEL fenotipa kodirane DEL alelima. Po prvi put u hrvatskoj populaciji dokazana je prisutnost DEL alela. U jednoj populaciji europskog porijekla i uopće izvan Kine, po prvi put je dokazana ekspresija antigena D DEL fenotipa u hemizigotne osobe za *RHD* s alelom *RHD\*EL01.44*.

Iz objektivnih razloga nije bilo moguće izravno prikazati vezu između upotrebljavanog reagensa anti-D i proteina RhCE modificirane strukture u ispitanika s hibridnim alelom na lokusu *RHCE*, čime bi se direktno dokazala povezanost molekularnih rezultata s rezultatom testa adsorpcije i elucije. Sekvenciranje DNA bilo je ograničeno uporabom početnica za egzone *RHD*, što je bio razlog neuspjeha sekvenciranja hibridnog alela na lokusu *RHCE*. Buduća slična istraživanja trebala bi uzeti u obzir navedena ograničenja ovog istraživanja. Svi ispitanici s utvrđenom sekvencom gena *RHD* dugogodišnji su davatelji krvi. Prije ovog istraživanja krvnim pripravcima iz njihovih doza krvi liječeni su RhD negativni pacijenti. Uzorci ispitanika s dokazanim alelima sustava Rh opisani u ovom istraživanju bili su serološki neupadljivo RhD negativni i njihov Rh-fenotip nikako se ne bi mogao odrediti bez uporabe metoda molekularne biologije. Zbog toga je važna primjena algoritma za molekularno testiranje alela sustava Rh, osobito za nove davatelje krvi, kako bi se pojava nepodudarnih transfuzija krvi ubuduće značajno smanjila.

Potrebno je provesti još mnogo istraživanja s opisom i povezanosti strukture gena sustava Rh i fenotipskih obilježja, izrada odgovarajućih baza podataka i sl. Namjera je ovog istraživanja bila dati doprinos znanstvenim spoznajama u tom najsloženijem sustavu krvnih grupa. Iz rezultata ovog istraživanja i prikazane rasprave nameće se klinička važnost molekularnog testiranja serološki RhD negativnih davatelja krvi, zbog čega je predložen algoritam za uvođenje molekularnog testiranja uzoraka davatelja krvi. Testiranje DNA davatelja krvi omogućuje sigurniju primjenu krvnih pripravaka sprečavanjem neželjene imunizacije u RhD negativnih pacijenata RhD pozitivnom dozom krvi koja je u serološkom testiranju reagirala negativno.



## 6. ZAKLJUČCI

Istraživanje polimorfizma alela sustava Rh u serološki RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske može se sažeti u nekoliko zaključaka povezanih s prisutnosti i učestalosti alela sustava Rh u ispitivanoj populaciji te njihovoj kliničkoj važnosti:

1. U populaciji serološki RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske gen *RHD* određen je u 0,28 % ispitanika. Utvrđena su dva alela *RHD* iz grupe DEL alela, koja kodiraju antigene D DEL fenotipa, *RHD\*01EL.32* i *RHD\*01EL.44*, svaki s učestalosti alela od 0,07 % (1 : 1408). Ovo je prvi opis DEL alela u Hrvatskoj. U skupini homozigota *RHCE\*01* učestalost ispitanika s alelom *RHD* bila je 0,00 %. Učestalost ispitanika s alelom *RHD* unutar skupine C- i/ili E-pozitivnih davatelja krvi bila je 1,74 %. Oba opisana alela *RHD* bila su u ispitanika s fenotipom Ccee.
2. Za oba alela *RHD* pretpostavljena je haplotipska povezanost s alelom *RHCE\*02* na temelju učestalosti haplotipova. Učestalost haplotipova s alelom *RHD* (haplotipovi *DCe*) bila je 0,14 %, a utvrđeni su u 0,28 % ispitanika. Prema fenotipu obaju ispitanika s alelom *RHD* preostali haplotip bio je *dce*. Time je za oba ispitanika utvrđen genotip *DCe/dce*, s učestalošću u ispitivanoj populaciji 0,28 %.
3. Nije utvrđena statistički značajna razlika između učestalosti ispitanika s alelom *RHD* u ovom i sličnim istraživanjima u RhD negativnih davatelja krvi u europskim populacijama, dok u usporedbi s neeuropskim populacijama ona postoji.
4. Oba pronađena alela *RHD* imaju dokazanu ekspresiju RhD na eritrocitima. Radi se o antigenima DEL fenotipa, koji se ne mogu odrediti rutinskim serološkim testiranjem. Ovo istraživanje prvi je opis DEL fenotipa produkta alela *RHD\*01EL.44* izvan Kine i u populaciji europskog porijekla. U jednog ispitanika (0,14 %) fenotipa Ccee s potvrđenom delecijom gena *RHD* na lokusu *RHCE* pronađen je hibridni alel strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*, odnosno *RHCE\*D(1)-CE*. Po prvi put na svjetskoj razini pokazano je da produkt tog hibridnog alela ima ekspresiju epitopa RhD. Po prvi put u Hrvatskoj dokazan je polimorfizam lokusa *RHCE* različit od alela za klinički najvažnije antigene C, c, E i e. Opisana je hipoteza konverzije gena kojom je odsječak sekvence *RHD* postao dio sekvence hibridnog alela. Prema rezultatima ovog istraživanja otkriveni alel podtip je alela *RHCE\*02*.

5. Na temelju plana i rezultata ovog istraživanja predložen je algoritam uvođenja molekularne dijagnostike alela sustava Rh za rutinsko testiranje davatelja krvi. U prva dva davanja krvi serološki RhD negativni uzorci testiraju se ovisno o Rh-fenotipu: uzorci fenotipa ccee najprije se testiraju probirnim testom za *RHD* s tri egzona gena *RHD*, a pozitivni uzorci u probirnom testu i uzorci drugih Rh-fenotipova (C+ i/ili E+) testom za proširenu tipizaciju alela sustava Rh. Rezultat molekularnog testiranja alela sustava Rh davatelja pohranjen je u informatičkom sustavu za sva daljnja davanja krvi te služi rješavanju nesukladnih rezultata serološkog testiranja. Implementacija ovog algoritma doprinjet će smanjenju broja nepodudarnih transfuzija krvi u sustavu Rh i mogućih imunizacija primatelja krvnih pripravaka.

## 7. LITERATURA

1. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party [Internet]. International Society for Blood Transfusion [pristupljeno 11.2.2022.]. Dostupno na: <https://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>.
2. Daniels G. Human Blood Groups: Introduction. In: Daniels G. Human blood groups, 3rd edition. Wiley Blackwell; 2013:1-10.
3. Table of blood group antigens v10.0 30-JUN-2021 [Internet]. International Society for Blood Transfusion; 2021 [pristupljeno 17.1.2022.]. Dostupno na: [https://www.isbtweb.org/fileadmin/user\\_upload/Table\\_of\\_blood\\_group\\_systems\\_v10.0\\_30-JUN-2021\\_with\\_LRG\\_and\\_revised\\_antigens.pdf](https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Table_of_blood_group_systems_v10.0_30-JUN-2021_with_LRG_and_revised_antigens.pdf).
4. Table of blood group antigens within systems v10.0 30-JUN-2021 [Internet]. International Society for Blood Transfusion; 2021 [pristupljeno 17.1.2022.]. Dostupno na: [https://www.isbtweb.org/fileadmin/user\\_upload/Table\\_of\\_blood\\_group\\_antigens\\_within\\_systems\\_v10.0\\_30-JUN-2021.pdf](https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Table_of_blood_group_antigens_within_systems_v10.0_30-JUN-2021.pdf).
5. Gassner C. Introduction into molecular Red Blood Cell (RBC) Genotyping [webinar]. 28.4.2021. Pristupljeno 28.4.2021.
6. Landsteiner K. Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 1901;46:1132-1134.
7. Storry J. New molecules on the erythrocyte surface - blood group antigens as discovery tools. Usmeno predavanje na: 3rd International Blood Group Forum; November 21-22, 2016; Frankfurt, Germany.
8. Chérif-Zahar B, Mattéi MG, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron JP, Colin Y. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. *Hum Genet*. 1991;86(4):398-400.
9. Suto Y, Ishikawa Y, Hyodo H, Uchikawa M, Juji T. Gene organization and rearrangements at the human Rhesus blood group locus revealed by fiber-FISH analysis. *Hum Genet*. 2000;106:164-171.
10. Daniels G. Rh and RHAG Blood Group Systems. In: Daniels G. Human blood groups, 3rd edition. Wiley Blackwell; 2013:182-258.
11. (ISBT 004) RHD blood group alleles v6.0 30-NOV-2021 [Internet]. International Society for Blood Transfusion; 2021 [pristupljeno 17.1.2022.]. Dostupno na: [https://www.isbtweb.org/fileadmin/user\\_upload/Working\\_parties/WP\\_on\\_Red\\_Cell\\_Immunogenetics\\_and\\_ISBT\\_004\\_RHD\\_blood\\_group\\_alleles\\_v6.0\\_30-NOV-2021.pdf](https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and_ISBT_004_RHD_blood_group_alleles_v6.0_30-NOV-2021.pdf).
12. Okuda H, Sukanuma H, Kamesaki T, Kumada M, Tsudo N, Omi T, Iwamoto S, Kajii E. The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between RHD and RHCE genes through complete sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274(3):670-683.
13. (ISBT 004) RHCE blood group alleles v6.1-23-AUG-2021 [Internet]. International Society for Blood Transfusion; 2021 [pristupljeno 17.1.2022.]. Dostupno na: [https://www.isbtweb.org/fileadmin/user\\_upload/ISBT\\_004\\_RHCE\\_blood\\_group\\_alleles\\_v6.1-23-AUG-2021.pdf](https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/ISBT_004_RHCE_blood_group_alleles_v6.1-23-AUG-2021.pdf).

14. Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D67-D72.
15. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, Henry S, Jørgensen J, Judd WJ, Levene C, Lomas-Francis C, Moulds JJ, Moulds JM, Moulds M, Overbeeke M, Reid ME, Rouger P, Scott M, Sistonen P, Smart E, Tani Y, Wendel S, Zelinski T; International Society of Blood Transfusion. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang.* 2004;87(4):304-316.
16. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. The IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Research.* 2020;48:D948-D955.
17. Tills D, Kopec AC, Tills RE. The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms, Supplement 1. Oxford: Oxford University Press; 1983.
18. Fisher RA. Cited by Race RR. in An 'incomplete' antibody in human serum [Letter to the editor]. *Nature.* 1944;153:771-772.
19. Ridgwell K, Spurr NK, Laguda B, MacGeoch C, Avent ND, Tanner MJ. Isolation of cDNA clones for a 50 kDa glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (rhesus) blood-group antigen expression. *Biochem J.* 1992;287:223-228.
20. Nicolas V, Mouro-Chanteloup I, Lopez C, Gane P, Gimm A, Mohandas N, Cartron JP, Le Van Kim C, Colin Y. Functional interactions between Rh proteins and the spectrin-based skeleton in erythroid and epithelial cells. *Transfus Clin Biol.* 2006;13(1-2):23-28.
21. Conroy MJ, Bullough PA, Merrick M, Avent ND. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br J Haematol.* 2005;131:543-551.
22. Burton NM, Daniels G. Structural modelling of red cell surface proteins. *Vox Sang.* 2011;100:129-139.
23. Callebaut I, Dulin F, Bertrand O, Ripoche P, Mouro I, Colin Y, Mornon JP, Cartron JP. Hydrophobic cluster analysis and modeling of the human Rh protein three-dimensional structures. *Transfus Clin Biol.* 2006;13(1-2):70-84.
24. Huang CH, Peng J. Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(43):15512-15517.
25. Gahmberg CG. Molecular characterization of the human red cell Rh<sub>0</sub>(D) antigen. *EMBO J.* 1983;2:223-227.
26. Moore S, Woodrow CF, McClelland DBL. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (c̄), (E) and Fy<sup>a</sup>. *Nature.* 1982;295:529-531.
27. Gahmberg CG. Molecular identification of the human Rh<sub>0</sub>(D) antigen. *FEBS Letts.* 1982;140:93-97.
28. Hartel-Schenk S, Agre P. Mammalian red cell membrane Rh polypeptides are selectively palmitoylated subunits of a macromolecular complex. *J Biol Chem.* 1992;267(8):5569-5574.
29. de Vetten MP, Agre P. The Rh polypeptide is a major fatty acid-acylated erythrocyte membrane protein. *J Biol Chem.* 1988;263(34):18193-18196.
30. Chérif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P, Salmon C, Cartron JP, Colin Y. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(16):6243-6247.

31. Avent ND, Ridgwell K, Tanner MJA, Anstee DJ. cDNA cloning of a 30 kDa erythrocyte membrane protein associated with Rh (Rhesus)-blood-group-antigen expression. *Biochem J.* 1990;271(3):821-825.
32. Simsek S, de Jong CA, Cuijpers HT, Bleeker PM, Westers TM, Overbeeke MA, Goldschmeding R, van der Schoot CE, von dem Borne AE. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of E/e and C/c polymorphisms. *Vox Sang.* 1994;67(2):203-209.
33. Avent ND. New insight into the Rh system: structure and function. *ISBT Sci Ser.* 2007;2:35-43.
34. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci.* 2011;44(1):81-91.
35. de Brevern AG, Floch A, Barrault A, Martret J, Bodivit G, Djoudi R, Pirenne F, Tournamille C. Alloimmunization risk associated with amino acid 223 substitution in the RhD protein: analysis in the light of molecular modeling. *Transfusion.* 2018;58(11):2683-2692.
36. Floch A, Pirenne F, Barrault A, Chami B, Toly-Ndour C, Tournamille C, de Brevern AG. Insights into anti-D formation in carriers of RhD variants through studies of 3D intraprotein interactions. *Transfusion.* 2021;61(4):1286-301.
37. Dunstan RA, Simpson MB, Rosse WF. Erythrocyte antigens on human platelets. Absence of Rh, Duffy, Kell, Kidd, and Lutheran antigens. *Transfusion.* 1984;24(3):243-246.
38. Dunstan RA. Status of major red cell blood group antigens on neutrophils, lymphocytes and monocytes. *Br J Haematol.* 1986;62(2):301-309.
39. Gemke RJ, Kanhai HH, Overbeeke MA, Maas CJ, Bennebroek Gravenhorst J, Bernini LF, Engelfriet CP, van't Veer MB. ABO and Rhesus phenotyping of fetal erythrocytes in the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol.* 1986;64(4):689-697.
40. Marini AM, Matassi G, Raynal V, André B, Cartron JP, Chérif-Zahar B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nature Genet.* 2000;26(3):341-344.
41. Soupene E, Inwood W, Kustu S. Lack of Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(20):7787-7792.
42. Chérif-Zahar B, Raynal V, Cartron JP. RH gene structure: reassignment of two exon-exon junctions [Letter to the editor]. *Blood.* 1997;89(12):4661-4662.
43. Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Rouillac C, Raynal V, Cartron JP, Colin Y. Organization of the gene (*RHCE*) encoding the human blood group RhCcEe antigens and characterization of the promoter region. *Genomics.* 1994;19(1):68-74.
44. Wagner FF, Flegel WA. *RHD* gene deletion occurred in the *Rhesus* box. *Blood.* 2000;95(12):3662-3668.
45. Huang CH, Blumenfeld OO. MNS blood groups and major glycoporphins. Molecular basis for allelic variation. In: Cartron JP, Rouger P (eds.). *Blood Cell Biochemistry*, vol. 6. New York: Plenum, 1995:153-188.
46. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. *RHD* positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet.* 2001;2:10.

47. Matassi G, Chérif-Zahar B, Mouro I, Cartron JP. Characterization of the recombination hot spot involved in the genomic rearrangement leading to the hybrid *D-CE-D* gene in the D<sup>VI</sup> phenotype. *Am J Hum Genet.* 1997;60(4):808-817.
48. Matassi G, Chérif - Zahar B, Pesole G, Raynal V, Cartron JP. The members of the *RH* gene family (*RH50* and *RH30*) followed different evolutionary pathways. *J Mol Evol.* 1999;48(2):151-159.
49. Kitano Y, Saitou N. Evolutionary history of the *Rh* blood group-related genes in vertebrates. *Immunogenetics.* 2000;51(10):856-862.
50. Westhoff CM, Wylie DE. Investigation of the human Rh blood group system in nonhuman primates and other species with serologic and Southern blot analysis. *J Mol Evol.* 1994;39(1):87-92.
51. Carritt B, Kemp TJ, Poulter M. Evolution of the human RH (Rhesus) blood group genes: a 50-year-old prediction (partially) fulfilled. *Hum Mol Genet.* 1997;6(6):843-850.
52. Blancher A, Reid ME, Socha WW. Cross-reactivity of antibodies to human and primate red cell antigens. *Transfus Med Rev.* 2000;14(2):161-179.
53. Suto Y, Ishikawa Y, Hyodo H, Ishida T, Kasai F, Tanoue T, Hayasaka I, Uchikawa M, Juji T, Hirai M. Gene arrangement at the Rhesus blood group locus of chimpanzees detected by fiber-FISH. *Cytogenet Genome Res.* 2003;101(2):161-165.
54. Wagner FF, Flegel WA. *RHCE* represents the ancestral *RH* position, while *RHD* is the duplicated gene. *Blood.* 2002;99(6):2272-2274.
55. Perry GH, Xue Y, Smith RS, Meyer WK, Calışkan M, Yanez-Cuna O, Lee AS, Gutiérrez-Arcelus M, Ober C, Hollox EJ, Tyler-Smith C, Lee C. Evolutionary genetics of the human Rh blood group system. *Hum Genet.* 2012;131(7):1205-1216.
56. Yazer MH, Triulzi DJ, Sperry JL, Seheult JN. Rate of RhD-alloimmunization after the transfusion of multiple RhD-positive primary red blood cell-containing products. *Transfusion.* 2021;61:S150-S158.
57. Yazer MH, Triulzi DJ, Sperry JL, Corcos AC, Seheult JN. Rate of RhD-alloimmunization after the transfusion of RhD-positive red blood cell containing products among injured patients of childbearing age: single center experience and narrative literature review. *Hematology.* 2021;26(1):321-327.
58. Gonzalez-Porrás JR, Graciani IF, Perez-Simon JA, Martin-Sanchez J, Encinas C, Conde MP, Nieto MJ, Corral M. Prospective evaluation of a transfusion policy of D+ red blood cells into D- patients. *Transfusion.* 2008;48(7):1318-1324.
59. Yazer MH, Triulzi DJ. Detection of anti-D in D- recipients transfused with D+ red blood cells. *Transfusion.* 2007;47(12):2197-2201.
60. Wagner FF, Flegel WA. The Rhesus Site. *Transfus Med Hemother.* 2014;41(5):357-363. The Human RhesusBase, version 2.5.2.
61. Stratton F. A new Rh allelomorph. *Nature.* 1946;158:25.
62. Gorick B, McDougall DC, Ouwehand WH, Overbeeke MA, Tippett P, Hughes-Jones NC, van Rhenen DJ. Quantitation of D sites on selected 'weak D' and 'partial D' red cells. *Vox Sang.* 1993;65(2):136-140.

63. Merry AH, Hodson C, Moore S. Variation in the level of Rh(D) antigen expression. *Transfusion*. 1988;28(4):397-398.
64. Agre PC, Davies DM, Issitt PD, Lamy BM, Schmidt PJ, Treacy M, Vengelen-Tyler V. A proposal to standardize terminology for weak D antigen. *Transfusion*. 1992;32(1):86-87.
65. Contreras M, Knight RC. Controversies in transfusion medicine. Testing for D<sup>u</sup>:Con. *Transfusion*. 1991;31(3):270-272.
66. Argall CI, Ball JM, Trentelman E. Presence of anti-D antibody in the serum of a D<sup>u</sup> patient. *J Lab Clin Med*. 1953;41(6):895-898.
67. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*. 1999;93(1):385-393.
68. Daniels G, Poole G, Poole J. Partial D and weak D: can they be distinguished? *Transfus Med*. 2007;17(2):145-146.
69. Tippett P, Sanger R. Observations on subdivisions of the Rh antigen D. *Vox Sang*. 1962;7:9-13.
70. Scott M. Section 1A: Rh serology. Coordinator's report. *Transfus Clin Biol*. 2002;9(1):23-29.
71. Liu W, Avent ND, Jones JW, Scott ML, Voak D. Molecular configuration of Rh D epitopes as defined by site-directed mutagenesis and expression of mutant Rh constructs in K562 erythroleukemia cells. *Blood*. 1999;94(12):3986-3996.
72. Chang TY, Siegel DL. Genetic and immunological properties of phage-displayed human anti-Rh(D) antibodies: implications for Rh(D) epitope topology. *Blood*. 1998;91(8):3066-3078.
73. Silvy M, Chapel-Fernandes S, Callebaut I, Beley S, Durousseau C, Simon S, Lauroua P, Dubosc-Marchenay N, Babault C, Mouchet C, Ferrera V, Chiaroni J, Bailly P. Characterization of novel *RHD* alleles: relationship between phenotype, genotype, and trimeric architecture. *Transfusion*. 2012;52(9):2020-2069.
74. Dogic V, Bingulac-Popovic J, Babic I, Hundric-Haspl Z, Jurakovic-Loncar N, Mratinovic-Mikulandra J, Vuk T, Balijsa M, Jukic I. Distribution of weak D types in the Croatian population [Letter to the editor]. *Transfus Med*. 2011;21(4):278-279.
75. Rodrigues MJ, Rodrigues F, Tilley L, Poole J, Chabert T, Souza G. Several new examples of weak D type 38 in the Portuguese population. *Transfusion*. 2006;46(Suppl.):141A-142A [Abstract].
76. Floch A, Téletchéa S, Tournamille C, de Brevern AG, Pirenne F. A review of the literature organized into a new database: RHeference. *Transfus Med Rev*. 2021;35(2):70-77.
77. Sun CF, Chou CS, Lai NC, Wang WT. RHD gene polymorphisms among RhD-negative Chinese in Taiwan. *Vox Sang*. 1998;75(1):52-57.
78. Flegel WA, Wagner FF. DEL [editorial]. *Blood Transfus*. 2020;18(3):159-162.
79. Fukumori Y, Hori Y, Ohnoki S, Nagao N, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H. Further analysis of D<sub>el</sub> (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with *RHD* gene-specific primers. *Transfus Med*. 1997;7(3):227-231.
80. Li Q, Hou L, Ye LY, Yue DQ, Zhu ZY. Molecular basis of the *RHD* gene in blood donors with DEL phenotypes in Shanghai. *Vox Sang*. 2009;97(2):139-146.

81. Qu X, Grootkerk-Tax MGHM, Maaskant-van Wijk PA, van der Schoot CE. Systemic analysis and zygosity determination of the *RHD* gene in a D-negative Chinese Han population reveals a novel D-negative *RHD* gene. *Vox Sang.* 2005;88(1):35-40.
82. Liu HC, Eng HL, Yang YF, Wang YH, Lin KT, Wu HL, Lin TM. Aberrant RNA splicing in *RHD* 7-9 exons of DEL individuals in Taiwan: A mechanism study. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(6):565-573.
83. Kim JY, Kim SY, Kim CA, Yon GS, Park SS. Molecular characterization of D- Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion.* 2005;45(3):345-352.
84. Shao CP, Xiong W, Zhou YY. Multiple isoforms excluding normal RhD mRNA detected in Rh blood group D<sub>el</sub> phenotype with *RHD* 1227A allele. *Transfus Apher Sci.* 2006;34(2):142-152.
85. Shao CP, Maas JH, Su YQ, Köhler M, Legler TJ. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D<sub>el</sub> and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang.* 2002;83(2):156-161.
86. Körmöczzi GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion.* 2005;45(10):1561-1567.
87. Gassner C, Doescher A, Dovec Drnovsek T, Rozman P, Eicher NI, Legler TJ, Lukin S, Garritsen H, Kleinrath T, Egger B, Ehling R, Körmöczzi GF, Kilga-Nogler S, Schoenitzer D, Petershofen EK. Presence of *RHD* in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion.* 2005;45(4):527-538.
88. Richard M, Perreault J, Constanzo-Yanez J, Khalifé S, St-Louis M. A new DEL variant caused by exon 8 deletion. *Transfusion.* 2007;47(5):852-857.
89. Flegel WA, von Zabern I, Wagner FF. Six years' experience performing *RHD* genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion.* 2009;49(3):465-471.
90. Dajak S, Lukacevic Krstic J, Körmöczzi G, Dogic V, Burilovic V. Characteristics and frequency of DEL phenotype detected by indirect antiglobulin test in Dalmatia county of Croatia. *Transfus Apher Sci.* 2014;50(2):210-213.
91. Safic Stanic H, Dogic V, Herceg I, Jagnjic S, Bingulac-Popovic J, Babic I, Corusic A, Jukic I. D variants in the population of D-negative blood donors in the north-eastern region of Croatia. *Transfus Med.* 2021;31(1):43-47.
92. Guzijan G, Jovanovic Srzentic S, Pavlovic Jankovic N, Djilas I, Lilic M. Implementation of molecular *RHD* typing at two blood transfusion institutes from southeastern Europe. *Transfus Med Hemother.* 2019;46(2):114-120.
93. Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood.* 1991;78(10):2747-2752.
94. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood.* 2000;95(1):12-18.
95. Wagner FF, Moulds JM, Tounkara A, Kouriba B, Flegel WA. *RHD* allele distribution in Africans of Mali. *BMC Genet.* 2003;4:14.
96. Kwon DH, Sandler SG, Flegel WA. DEL phenotype. *Immunohematology.* 2017;33(3):125-132.



97. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*. 2004;20(1):23-36.
98. Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, Heymann GA, Eicher NI, Flegel WA. The *DAU* allele cluster of the *RHD* gene. *Blood*. 2002;100(1):306-311.
99. Flegel WA, von Zabern I, Doescher A, Wagner FF, Strathmann KP, Geisen C, Palfi M, Písacka M, Poole J, Polin H, Gabriel C, Avent ND. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian clusters. *Transfusion*. 2009;49(6):1059-1069.
100. Smythe JS, Anstee DJ. Expression of C antigen in transduced K562 cells. *Transfusion*. 2001;41(1):24-30.
101. Tournamille C, Meunier-Costes N, Costes B, Martret J, Barrault A, Gauthier P, Galactéros F, Nzouékou R, Bierling P, Noizat-Pirenne F. Partial C antigen in sickle cell disease patients: clinical relevance and prevention of alloimmunization. *Transfusion*. 2010;50(1):13-19.
102. Westhoff CM, Silberstein LE, Wylie DE, Skavdahl M, Reif ME. 16Cys encoded by the *RHce* gene is associated with altered expression of the e antigen and is frequent in the R<sub>0</sub> haplotype. *Br J Haematol*. 2001;113(3):666-671.
103. Poulter M, Kemp TJ, Carritt B. DNA-based Rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction. *Vox Sang*. 1996;70(3):164-168.
104. Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K. The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press, 1976.
105. Green FA. Studies of the Rh (D) antigen. *Vox Sang*. 1965;10:32-53.
106. Daniels GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serological and molecular analysis. *Transfusion*. 1998;38(10):951-958.
107. Gassner C, Schmarda A, Kilga-Nogler S, Jenny-Feldkircher B, Rainer E, Müller TH, Wagner FF, Flegel WA, Schönitzer D. *RHD/CE* typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Transfusion*. 1997;37(10):1020-1026.
108. Sanchez-Mazas A, Vidan-Jeras B, Nunes JM, Fischer G, Little AM, Bekmane U, Buhler S, Buus S, Claas FH, Dormoy A, Dubois V, Eglite E, Eliaou JF, Gonzalez-Galarza F, Grubic Z, Ivanova M, Lie B, Ligeiro D, Lokki ML, da Silva BM, Martorell J, Mendonça D, Middleton D, Voniatas DP, Papasteriades C, Poli F, Riccio ME, Vlachou MS, Sulcebe G, Tonks S, Nevessignsky MT, Vangenot C, van Walraven AM, Tiercy JM. Strategies to work with HLA data in human populations for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics: HLA-NET methodological recommendations. *Int J Immunogenet*. 2012;39(6):459-476.
109. Browne T, Dearman RJ, Poles A. Human neutrophil antigens: Nature, clinical significance and detection. *Int J Immunogenet*. 2021;48(2):145-156.
110. Veldhuisen B, Porcelijn L, van der Schoot CE, de Haas M. Molecular typing of human platelet and neutrophil antigens (HPA and HNA). *Transfus Apher Sci*. 2014;50(2):189-199.
111. Reid ME, Rios M, Yazdanbakhsh K. Applications of molecular biology techniques to transfusion medicine. *Semin Hematol*. 2000;37(2):166-176.
112. Schoeman EM, Lopez GH, McGowan EC, Millard GM, O'Brien H, Roulis EV, Liew YW, Martin JR, McGrath KA, Powley T, Flower RL, Hyland CA. Evaluation of targeted exome sequencing for 28 protein-based blood group systems, including the homologous gene systems, for blood group genotyping. *Transfusion*. 2017;57(4):1078-1088.

113. Zhang Z, An HH, Vege S, Hu T, Zhang S, Mosbrugger T, Jayaraman P, Monos D, Westhoff CM, Chou ST. Accurate long-read sequencing allows assembly of the duplicated *RHD* and *RHCE* genes harboring variants relevant to blood transfusion. *Am J Hum Genet.* 2022;109(1):180-191.
114. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. *JAMA.* 1939;113(2):126-127.
115. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for Rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1940;43(1):223.
116. Landsteiner K, Wiener AS. Studies on an agglutinin (Rh) in human blood reacting with anti-rhesus sera and with human isoantibodies. *J Exp Med.* 1941;74(4):309-320.
117. Wiener AS, Peters HR. Hemolytic reactions following transfusions of blood of the homologous group, with three cases in which the same agglutinin was responsible. *Ann Intern Med.* 1940;13:2306-2322.
118. Levine P, Burnham L, Katzin EM, Vogel P. The role of iso-immunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. *Am J Obst Gynecol.* 1941;42(6):925-937.
119. Levine P, Celano MJ, Wallace J, Sanger R. A human "D-like" antibody. *Nature.* 1963;198:596-597.
120. Levine P, Katzin EM, Burnham L. Isoimmunization in pregnancy: its possible bearing on the etiology of erythroblastosis foetalis. *JAMA.* 1941;116(9):825-827.
121. Levine P, Vogel P, Katzin EM, Burnham L. Pathogenesis of erythroblastosis fetalis: statistical evidence. *Science.* 1941;94(2442):371-372.
122. Klein HK, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 11th edn. Oxford: Blackwell Publishing, 2005.
123. Dohmen SE, Verhagen OJHM, Muijt J, Ligthart PC, van der Schoot CE. The restricted use of IGHV3 superspecies genes in anti-Rh is not limited to hyperimmunized anti-D donors. *Transfusion.* 2006;46(12):2162-2168.
124. Ayland J, Horton MA, Tippett P, Waters AH. Complement binding anti-D made in a D<sup>u</sup> variant woman. *Vox Sang.* 1978;34(1):40-42.
125. De Souza CP, Baleotti W, Moritz E, Sanches S, Lopes LB, Chiba AK, Donadi EA, Bordin JO. HLA-DRB1 molecules and the presentation of anchor peptides from RhD, RhCE, and KEL proteins. *Transfusion.* 2021;61(5):1617-1630.
126. Raos M, Zunec R, Mocibob M, Gojceta K, Lukic M, Golubic Cepulic B. Susceptible and protective HLA-DR and HLA-DQ alleles for Fy<sup>a</sup> alloimmunization in the Croatian population. *Transfusion.* 2019;59(3):1118-1124.
127. Hackney DN, Knudtson EJ, Rossi KQ, Krugh D, O'Shaughnessy RW. Management of pregnancies complicated by anti-c isoimmunization. *Obstet Gynecol.* 2004;103(1):24-30.
128. Frohn C, Dümbgen L, Brand JM, Görg S, Luhm J, Kirchner H. Probability of anti-D development in D<sup>-</sup> patients receiving D<sup>+</sup> RBCs. *Transfusion.* 2003;43(7):893-898.
129. Yuan S, Davis R, Lu Q, Goldfinger D, Ziman AF. Low risk of alloimmunization to the D antigen in D<sup>-</sup> orthotopic liver transplant recipients receiving D<sup>+</sup> RBCs perioperatively [Letter to the editor]. *Transfusion.* 2008;48(12):2653-2655.
130. Tovey LAD. Towards the conquest of Rh haemolytic disease: Britain's contribution and the role of serendipity. *Transfus Med.* 1992;2(2):99-109.

131. Jones ML, Wray J, Wight J, Chilcott J, Forman K, Tappenden P, Beverley C. A review of the clinical effectiveness of routine antenatal anti-D prophylaxis for rhesus-negative women who are pregnant. *BJOG*. 2004;111(9):892-902.
132. Kumar S, Regan F. Management of pregnancies with RhD alloimmunisation. *BMJ*. 2005;330(7502):1255-1258.
133. Moise KJ Jr. Management of Rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2008;112(1):164-176.
134. Béliard R. Monoclonal anti-D antibodies to prevent alloimmunization: lessons from clinical trials. *Transfus Clin Biol*. 2006;13(1-2):58-64.
135. Kumpel BM. Efficacy of Rh monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. *Vox Sang*. 2007;93(2):99-111.
136. Stott LM, Barker RN, Urbaniak SJ. Identification of alloreactive T-cell epitopes on the Rhesus D protein. *Blood*. 2000;96(13):4011-4019.
137. Hall AM, Cairns LS, Altmann DM, Barker RN, Urbaniak SJ. Immune responses and tolerance to the RhD blood group protein in HLA-transgenic mice. *Blood*. 2005;105(5):2175-179.
138. Dooren MC, Kuijpers RWAM, Joekes EC, Huiskes E, Goldschmeding R, Overbeeke MAM, Engelfriet CP, von dem Borne AE, Ouweland WH. Protection against immune haemolytic disease of newborn infants by maternal monocyte-reactive IgG alloantibodies (anti-HLA-DR). *Lancet*. 1992;339(8801):1067-1070.
139. Shepard SL, Noble AL, Filbey D, Hadley AG. Inhibition of the monocyte chemiluminescent response to anti-D-sensitized red cells by FcγRI-blocking antibodies which ameliorate the severity of haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang*. 1996;70(3):157-163.
140. Council of Europe. Committee of Ministers. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components: Recommendation No. R (95) 15. 20th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2020.
141. Working Party of the British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfus Med* 2004;14(1):59-73.
142. AABB. Standards for blood banks and transfusion services, 27th ed. Bethesda, MD: AABB Press, 2011.
143. Flegel WA, Denomme GA, Queenan JT, Johnson ST, Keller MA, Westhoff CM, Katz LM, Delaney M, Vassallo RR, Simon CD, Sandler SG. It's time to phase out "serologic weak D phenotype" and resolve D types with *RHD* genotyping including weak D type 4. *Transfusion*. 2020;60(4):855-859.
144. Juraković Lončar N, Stojić Vidović M. Preporuke za imunohematološko testiranje davatelja krvi u transfuzijskoj djelatnosti RH [Internet]. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu; 2016 [pristupljeno 17.1.2022.] Dostupno na: <http://www.hztm.hr/dokumenti/preporuke-za-ih-testiranje-2016-za-stampanje.pdf>.
145. Wagner T, Körmöczy GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, Legler TJ. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*. 2005;45(4):520-526.
146. Chen W, Li L, Tsai SL, Lin K. Anti-D immunization by D<sub>e1</sub> red blood cells in Taiwan: two case reports. *Transfusion*. 2006;46(Suppl.):129A [Abstract].

147. Flegel WA, Khull SR, Wagner FF. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. *Transfusion*. 2000;40(4):428-434.
148. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues Á, Kutner JM, Castilho L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang*. 2005;88(2):130-135.
149. Gowland P, Gassner C, Hustinx H, Stolz M, Gottschalk J, Tissot JD, Thierbach J, Maier A, Sigurdardottir S, Still F, Fontana S, Frey BM, Niederhauser C. Molecular *RHD* screening of RhD negative donors can replace standard serological testing for RhD negative donors. *Transfus Apher Sci*. 2014;50(2):163-168.
150. Crottet SL, Henny C, Meyer S, Still F, Stolz M, Gottschalk J, Neuenschwander K, Taleghani BM, Gowland P, Frey BM, Fontana S, Hustinx H, Niederhauser C, Gassner C. Implementation of a mandatory donor *RHD* screening in Switzerland. *Transfus Apher Sci*. 2014;50(2):169-174.
151. Dajak S, Ipavec N, Cuk M, Golubic Cepulic B, Mratinovic-Mikulandra J, Milardovic J, Stefanovic V. The outcome of hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-Rh17 antibody: analysis of three cases and review of the literature. *Transfus Med Hemother*. 2020;47(3):264-271.
152. Zakon o krvi i krvnim pripravcima, *Narodne novine*, 2006; 79/06.
153. Pravilnik o osiguranju kvalitete krvi i krvnih pripravaka u zdravstvenim ustanovama, *Narodne novine*, 2019; 91/19.
154. ID-Card DiaClon ABO/D + Reverse Grouping, product ID 50092, version B001228 6.13 [instructions for use]. Cressier, Switzerland: Bio-Rad Laboratories (DiaMed).
155. ID-Card DiaClon ABD-Confirmation for Donors, product ID 51051, version B001134 6.13 [instructions for use]. Cressier, Switzerland: Bio-Rad Laboratories (DiaMed).
156. DiaClon ABO/D + Reverse Grouping [Internet]. Bio-Rad Laboratories [pristupljeno 28.12.2021.]. Dostupno na: <https://www.bio-rad.com/en-hr/product/diaclon-abo-d-reverse-grouping?ID=LO32TI8UU>.
157. DiaClon ABD-Confirmation for Donors [Internet]. Bio-Rad Laboratories [pristupljeno 28.12.2021.]. Dostupno na: <https://www.bio-rad.com/en-hr/product/diaclon-abd-confirmation-for-donors?ID=LO33532B7>.
158. DiaMed-MP Test C, c, E, e, K, product ID 60300, version B110004 10.13 [instructions for use]. Cressier, Switzerland: Bio-Rad Laboratories (DiaMed).
159. MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I, version 25 [instructions for use]. Mannheim, Germany: Roche Diagnostics; November 2020.
160. Ready DNA Spin Kit, version 1.3 [instructions for use]. Kronberg, Germany: Inno-train Diagnostik; 2013.
161. Williams M, Boam S, Maley M, Nightingale MJ, Ash C, Finning K. Assessment and validation of Fluogene system for genotyping patients referred to RCI laboratories. *Transfus Med*. 2014;24(Suppl. 2):33-75, P101 [Abstract].
162. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(16):7276-7280.
163. RBC-FluoGene, version 3.2 [instructions for use]. Kronberg, Germany: Inno-train Diagnostik; 2020.

164. Zheng J. Spectroscopy-based quantitative fluorescence resonance energy transfer analysis. In Stockand JD, Shapiro MS (eds.). *Ion Channels. Methods in Molecular Biology*, vol. 337. New York: Humana Press, 2006:65–77.
165. Mullis KB, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. *Meth Enzym.* 1987;155:335-350.
166. Wagner FF, Moulds JM, Flegel WA. Genetic mechanisms of Rhesus box variation. *Transfusion.* 2005;45(3):338-334.
167. RBC-Ready Gene, version 3.1 [instructions for use]. Kronberg, Germany: Inno-train Diagnostik; 2019.
168. ORIGINS [technical manual]. Cham, Switzerland: Elchrom Scientific; September 2009.
169. Dunn PPJ. Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal. *Int J Immunogenet.* 2011;38(6):463-473.
170. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, Gauthier LD, Brand H, Solomonson M, Watts NA, Rhodes D, Singer-Berk M, England EM, Seaby EG, Kosmicki JA, Walters RK, Tashman K, Farjoun Y, Banks E, Poterba T, Wang A, Seed C, Whiffin N, Chong JX, Samocha KE, Pierce-Hoffman E, Zappala Z, O'Donnell-Luria AH, Minikel EV, Weisburd B, Lek M, Ware JS, Vittal C, Armean IM, Bergelson L, Cibulskis K, Connolly KM, Covarrubias M, Donnelly S, Ferreira S, Gabriel S, Gentry J, Gupta N, Jeandet T, Kaplan D, Llanwarne C, Munshi R, Novod S, Petrillo N, Roazen D, Ruano-Rubio V, Saltzman A, Schleicher M, Soto J, Tibbetts K, Tolonen C, Wade G, Talkowski ME; Genome Aggregation Database Consortium, Neale BM, Daly MJ, MacArthur DG. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581(7809):434–443.
171. Judd WJ, Susan TJ, Storry JR. *Judd's Methods in Immunohematology*. 3rd ed. Bethesda: AABB Press; 2008.
172. Daniel WW. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 7th ed. New York: John Wiley & Sons; 1999.
173. van der Schoot CE, Winkelhorst D, Clausen FB. *Noninvasive Fetal Blood Group Typing*. In: Editor(s): Page-Christiaens L, Klein HG (eds.). *Noninvasive Prenatal Testing (NIPT)*, Cambridge, MA: Academic Press, 2018:125-156.
174. Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA. Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in south-western Germany. *Infusionsther Transfusionsmed.* 1995;22(5):285-290.
175. Mota M, Dezan M, Valgueiro MC, Sakashita AM, Kutner JM, Castilho L. *RHD* allelic identification among D– Brazilian blood donors as a routine test using pools of DNA. *J Clin Lab Anal.* 2012;26(2):104-108.
176. Polin H, Danzer M, Gaszner W, Broda D, St-Louis M, Pröll J, Hofer K, Gabriel C. Identification of *RHD* alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D– blood donors in Upper Austria. *Transfusion*, 2009;49(4):676-681.
177. Orzińska A, Guz K, Polin H, Pelc-Kłopotowska M, Bednarz J, Gieleżyńska A, Sliwa B, Kowalewska M, Pawłowska E, Włodarczyk B, Malaga Alicja Żmudzin M, Krzemienowska M, Srivastava K, Michalewska B, Gabriel C, Flegel WA, Brojer E. *RHD* variants in Polish blood donors routinely typed as D–. *Transfusion*, 2013;53(11 Suppl 2):2945-2953.

178. Yin Q, Flegel WA. DEL in China: the D antigen among serologic RhD-negative individuals. *J Transl Med.* 2021;19(1):439.
179. Zimring JC, Welniak L, Semple JW, Ness PM, Slichter SJ, Spitalnik SL; NHLBI Alloimmunization Working Group. Current problems and future directions of transfusion-induced alloimmunization: summary of an NHLBI working group. *Transfusion.* 2011;51(2):435-441.
180. Klein HG, Anstee DJ. Haemolytic transfusion reactions. In: Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 11th ed. Oxford UK: Blackwell Publishing; 2005:455-495.
181. HPA Database [Internet]. Versiti; October 2020 [pristupljeno 11.2.2022.]. Dostupno na: <https://www.versiti.org/hpa>.
182. Tormey CA, Hendrickson JE. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences. *Blood.* 2019;133(17):1821-1830.
183. Garratty G. What is a clinically significant antibody? *ISBT Sci Ser.* 2012;7:54-57.
184. O'Suoji C, Liem RI, Mack AK, Kingsberry P, Ramsey G, Thompson AA. Alloimmunization in sickle cell anemia in the era of extended red cell typing. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(9):1487-1491.
185. Yee MEM, Josephson CD, Winkler AM, Webb J, Luban NLC, Leong T, Stowell SR, Fasano RM. Red blood cell minor antigen mismatches during chronic transfusion therapy for sickle cell anemia. *Transfusion.* 2017;57(11):2738-2746.
186. Matteocci A, Pierelli L. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia: current status, future perspectives and potential role of molecular typing. *Vox Sang.* 2014;106(3):197-208.
187. Wahl SK, Garcia A, Hagar W, Gildengorin G, Quirolo K, Vichinsky E. Lower alloimmunization rates in pediatric sickle cell patients on chronic erythrocytapheresis compared to chronic simple transfusions. *Transfusion.* 2012;52(12):2671-2676.
188. Ambruso DR. Transfusion complications in thalasseмии. *Transfusion.* 2014;54(4):957-959.
189. Belsito A, Costa D, Signoriello S, Fiorito C, Tartaglione I, Casale M, Perrotta S, Magnussen K, Napoli C. Clinical outcome of transfusions with extended red blood cell matching in  $\beta$ -thalassaemia patients: a single-center experience. *Transfus Apher Sci.* 2019;58(1):65-71.
190. Jovanovic Srzentic S, Lilic M, Vavic N, Radovic I, Djilas I. Genotyping of eight human platelet antigen systems in Serbian blood donors: foundation for platelet apheresis registry. *Transfus Med Hemother.* 2021;48(4):228-233.
191. Hayashi T, Hirayama F. Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies, and genotyping. *Blood Transfus.* 2015;13(3):380-390.
192. Feng ML, Liu DZ, Shen W, Wang JL, Guo ZH, Zhang X, Du KM, Qian KC, Zhao TM. Establishment of an HPA-1-to-16-typed platelet donor registry in China. *Transfus Med.* 2006;16(5):369-374.
193. Blanco S, Frutos MC, Carrizo LH, Nogués N, Gallego SV. Establishment of the first platelet-donor registry in Argentina. *Blood Transfus.* 2020;18(4):254-260.
194. Svensson AM, Delaney M. Considerations of red blood cell molecular testing in transfusion medicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(11):1455-1464.

195. Shin KH, Lee HJ, Park KH, Hye BM, Chang CL, Kim HH. Extended red blood cell genotyping to investigate immunohematology problems. *Ann Lab Med.* 2018;38(4):387-388.
196. Belsito A, Costa D, Napoli C. Blood group genotyping for patients with autoimmune hemolytic anemia. *Transl Res.* 2014;164(2):177-178.
197. Nooka AK, Kaufman JL, Hofmeister CC, Joseph NS. Daratumumab in multiple myeloma. *Cancer.* 2019;125(14):2364-2382.
198. van de Donk N, Richardson PG, Malavasi F. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future. *Blood.* 2018;131(1):13-29.
199. Roccatello D, Fenoglio R, Sciascia S, Naretto C, Rossi D, Ferro M, Barreca A, Malavasi F, Baldovino S. CD38 and anti-CD38 monoclonal antibodies in AL amyloidosis: targeting plasma cells and beyond. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):4129.
200. Konen JM, Fradette JJ, Gibbons DL. The good, the bad and the unknown of CD38 in the metabolic microenvironment and immune cell functionality of solid tumors. *Cells.* 2019;9(1):52.
201. Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD, Chapuy B, Laubach JP, Richardson PG, Doshi P, Kaufman RM. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion.* 2015;55(6 Pt 2):1545-1554.
202. Raos M, Bojanić I, Bašić Kinda S, Batinić J, Golubić Čepulić B. Prijetransfuzijsko ispitivanje i transfuzijsko liječenje pri primjeni monoklonskog protutijela anti-CD38. *Liječ Vjesn.* 2020;142:377-388.
203. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, Johnson ST, Katz L, Queenan JT, Vassallo RR, Simon CD; College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. It's time to phase in *RHD* genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion.* 2015;55(3):680-689.
204. Dezan MR, Guardalini LGO, Pessoa E, Ribeiro IH, Oliveira VB, Luz F, Novac DR, Gallucci A, Bonifácio S, Gomes F, Levi JE, Pereira AC, Krieger JE, Mendrone-Junior A, Rocha V, Dinardo CL. Evaluation of the applicability and effectiveness of a molecular strategy for identifying weak D and DEL phenotype among D- blood donors of mixed origin exhibiting high frequency of *RHD\*Ψ*. *Transfusion.* 2018;58(2):317-322.
205. Xu W, Zhu M, Wang BL, Su H, Wang M: Prospective evaluation of a transfusion policy of RhD-positive red blood cells into DEL patients in China. *Transfus Med Hemother.* 2015;42(1):15-21.
206. Ye L, Yue D, Wo D, Ding X, Guo S, Li Q, Guo Z, Zhu Z. Molecular bases of unexpressed *RHD* alleles in Chinese D- persons. *Transfusion.* 2009;49(8):1655-1660.
207. de Paula Vendrame TA, Prisco Arnoni C, Guilhem Muniz J, de Medeiros Person R, Pereira Cortez AJ, Roche Moreira Latini F, Castilho L. Characterization of *RHD* alleles present in serologically *RHD*-negative donors determined by a sensitive microplate technique. *Vox Sang.* 2019;114(8):869-875.
208. Tounsi WA, Madgett TE, Avent ND. Complete *RHD* next-generation sequencing: establishment of reference *RHD* alleles. *Blood Adv.* 2018;2(20):2713-2723.
209. Kim TY, Yu H, Cho D. The intronic variant *RHD*:c.149-29G>C designated as *RHD\*01EL.32* does not cause a DEL phenotype [Letter to the editor]. *Transfusion.* 2021;61(3):986-987.
210. Wagner FF. *RHD* PCR of D-negative blood donors. *Transfus Med Hemother.* 2013;40(3):172-181.

211. Rose AB. Introns as gene regulators: a brick on the accelerator. *Front Genet.* 2019;9:672.
212. Wheeler MM, Lannert KW, Huston H, Fletcher SN, Harris S, Teramura G, Maki HJ, Frazar C, Underwood JG, Shaffer T, Correa A, Delaney M, Reiner AP, Wilson JG, Nickerson DA, Johnsen JM; NHLBI Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Consortium. Genomic characterization of the *RH* locus detects complex and novel structural variation in multi-ethnic cohorts. *Genet Med.* 2019;21(2):477-486.
213. Mouro I, Le Van Kim C, Rouillac C, van Rhenen DJ, Le Pennec PY, Bailly P, Cartron JP, Colin Y. Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the DVI category phenotype. *Blood.* 1994;83(4):1129-1135.
214. Lilić M, Jaklin G, Gojčeta K, Raos M, Golubić Čepulić B. Molekularno određivanje alela *RHD* u populaciji RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske. 8. hrvatski transfuziološki kongres, Zagreb, 4.-7.11.2021. *Liječ Vjesn.* 2021;143(Supl. 2):52-53.
215. Wang M, Wang BL, Xu W, Fan DD, Peng ML, Pan J, Yao P, Jiang GM, Wan XJ. Anti-D alloimmunisation in pregnant women with DEL phenotype in China. *Transfus Med.* 2015;25(3):163-169.
216. Pereira J, Salvado R, Martins N, Ribeiro ML. RHD Null Alleles in the Portuguese Population. *Transfus Med.* 2009;19(S1):25, PO13 [Abstract].
217. Scott SA, Nagl L, Tilley L, Liew YW, Condon J, Flower R, Hyland CA. The *RHD*(1227G>A) DEL-associated allele is the most prevalent DEL allele in Australian D- blood donors with C+ and/or E+ phenotypes. *Transfusion.* 2014;54(11):2931-2940.
218. Kulkarni SS, Gogri H, Parchure D, Mishra G, Ghosh K, Rajadhyaksha S, Madkaikar M, Férec C, Fichou Y. *RHD*-positive alleles among D- C/E+ individuals from India. *Transfus Med Hemother.* 2018;45(3):173-177.
219. Trucco Boggione C, Nogués N, González-Santesteban C, Mufarrege N, Luján Brajovich M, Mattaloni SM, Leri M, Biondi C, Muñiz-Díaz E, Castilho L, Cotorruelo C. Characterization of *RHD* locus polymorphism in D negative and D variant donors from Northwestern Argentina. *Transfusion.* 2019;59(10):3236-3242.
220. Thongbut J, Laengsri V, Raud L, Promwong C, I-Na-Ayudhya C, Férec C, Nuchnoi P, Fichou Y. Nation-wide investigation of *RHD* variants in Thai blood donors: Impact for molecular diagnostics. *Transfusion.* 2020;61(3):931-938.
221. Shao CP, Xiong W. A new hybrid *RHD*-positive, D antigen-negative allele [Letter to the editor]. *Transfus Med.* 2004;14(2):185-186.
222. Ye LY, Guo ZH, Li Q, Zhu ZY. Molecular and family analyses revealed two novel *RHD* alleles in a survey of a Chinese RhD-negative population. *Vox Sang.* 2007;92(3):242-246.
223. Ji YL, Luo H, Wen JZ, Haer-Wigman L, Veldhuisen B, Wei L, Wang Z, Ligthart P, Lodén-van Straaten M, Fu YS, van der Schoot CE, Luo GP. *RHD* genotype and zygosity analysis in the Chinese Southern Han D+, D- and D variant donors using the multiplex ligation-dependent probe amplification assay. *Vox Sang.* 2017;112(7):660-670.
224. Westhoff CM, Storry JR, Walker P, Lomas-Francis C, Reid ME. A new hybrid RHCE gene (CeNR) is responsible for expression of a novel antigen. *Transfusion.* 2004;44(7):1047-1051.



225. Lim Y, Arora S, Schuster SL, Corey L, Fitzgibbon M, Wladyka CL, Wu X, Coleman IM, Delrow JJ, Corey E, True LD, Nelson PS, Ha G, Hsieh AC. Multiplexed functional genomic analysis of 5' untranslated region mutations across the spectrum of prostate cancer. *Nat Commun.* 2021;12(1):4217.
226. Popis stanovništva, kućanstava i stanova 2011: Stanovništvo prema državljanstvu, narodnosti, vjeri i materinskom jeziku, Statistička izvješća 1469, Državni zavod za statistiku, Zagreb, 2013.
227. Gojčeta K, Raos M, Lukić M, Plenković F, Bojanić I, Mazić S, Tomac G, Burnać I, Vidović I, Novoselac J, Golubić Čepulić B. Deset godina kliničkog iskustva s identifikacijom RHD alela. 7. hrvatski transfuziološki kongres, Biograd n/m, 15-17.9.2017. *Liječ Vjesn.* 2017;139(Supl. 1):25.
228. Londero D, Fiorino M, Miotti V, de Angelis V. Molecular RH blood group typing of serologically D-/CE+ donors: the use of a polymerase chain reaction-sequence-specific primer test kit with pooled samples. *Immunohematology.* 2011;27(1):25-28.
229. Sandler SG, Chen LN, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the *RHD* genotype. *Br J Haematol.* 2017;179(1):10-19.
230. Strauss Patko M, Očić T, Grubešić D, Babić I. Izvješće o rezultatima rada transfuzijske službe u 2020. godini. *Transfuziološki vjesnik.* 2020;65 [Internet]. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu [pristupljeno 3.2.2022]. Dostupno na: <http://www.hztm.hr/glasilo/65/rezultati-rada-transfuzijske-sluzbe-2020.html>.
231. Strauss Patko M, Očić T, Miletić M, Babić I. Izvješće o rezultatima rada transfuzijske službe u 2018. godini. *Transfuziološki vjesnik.* 2019;61 [Internet]. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu [pristupljeno 3.2.2022]. Dostupno na: <http://www.hztm.hr/glasilo/61/izvjesce-o-rezultatima-sluzbe.html>.
232. Strauss Patko M, Očić T, Miletić M, Babić I. Izvješće o rezultatima rada transfuzijske službe u 2019. godini. *Transfuziološki vjesnik.* 2020;63 [Internet]. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu [pristupljeno 3.2.2022]. Dostupno na: <http://www.hztm.hr/glasilo/63/rezultati-rada-transfuzijske-sluzbe-2019.html>.
233. Srivastava K, Stiles DA, Wagner FF, Flegel WA. Two large deletions extending beyond either end of the *RHD* gene and their red cell phenotypes. *J Hum Genet.* 2018;63(1):27-35.
234. Flegel WA, Wagner FF, Müller TH, Gassner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med.* 1998;8(4):281-302.
235. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350(9076):485-487.
236. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62(4):768-775.
237. Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn.* 2009;29(2):101-107.
238. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal genotyping from maternal blood: a meta analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(4):1163-1173.
239. van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LG, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol.* 2006;13(1-2):53-57.

240. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput *RHD* typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ*. 2008;336(7648):816-818.
241. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Olsson ML, Westgren M, Reilly M. Noninvasive single-exon fetal *RHD* determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2012;120(2 Pt 1):227-234.
242. Daniels G, Finning K, Wade A, Massey E, Soothill P, Phillips CJ, Martin WL, Chitty LS. Implementation of fetal *RHD* typing in all RhD-negative pregnant women: Timing, costs, and efficiency. *Vox Sang*. 2012;103(Suppl. 1):34 [Abstract].
243. Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, Jørgensen S, Nielsen C, Jakobsen MA, Madsen RD, Jensen K, Krog GR, Rieneck K, Sprogøe U, Homburg KM, Grunnet N, Dziegiel MH. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal *RHD* in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion*. 2012;52(4):752-758.
244. de Haas M, van der Ploeg CPB, Scheffer PG, Verlinden DA, Hirschberg H, Abbink F, van der Schoot CE. A nation-wide fetal *RHD* screening programme for targeted antenatal and postnatal anti-D. *ISBT Sci Ser*. 2012;7:164-167.
245. Sørensen K, Baevre MS, Tomter G, Llohn AH, Hagen KG, Espinosa A, Jacobsen B, Arsenovic MG, Sørvoll IH, Ulvahaug AN, Sundic T, Akkök ÇA. The Norwegian experience with nationwide implementation of fetal *RHD* genotyping and targeted routine antenatal anti-D prophylaxis. *Transfus Med*. 2021;31(5):314-321.
246. Bingulac-Popović J, Babić I, Đogić V, Kundid R, Simović Medica J, Mišković B, Jukić I. Prenatal *RHD* genotyping in Croatia: preliminary results. *Transfus Clin Biol*. 2021;28(1):38-43.
247. Perco P, Shao C-P, Mayr WR, Panzer S, Legler TJ. Testing for the D zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion*. 2003;43(3):335-339.
248. Pertl B, Pieber D, Panzitt T, Haeusler MCH, Winter R, Tului L, Brambati B, Adinolfi M. RhD genotyping by quantitative fluorescent polymerase chain reaction: a new approach. *BJOG*. 2000;107:1498-1502.
249. Fichou Y, Berlivet I, Richard G, Tournamille C, Castilho L, Férec C. Defining blood group gene reference alleles by long-read sequencing: proof of concept in the *ACKR1* gene encoding the Duffy antigens. *Transfus Med Hemother*. 2020;47(1):23-32.
250. Burek Kamenaric M, Maskalan M, Grubic Z, Stingl Jankovic K, Zunec R. Detection of novel and confirmation of very rare and rare HLA alleles by next generation sequencing in Croatia. *HLA*. 2020;96(1):70-75.
251. Tokić S, Žižkova V, Štefanić M, Glavaš-Obrovac L, Marczy S, Samardžija M, Sikorova K, Petrek M. HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, and -DQB1 allele and haplotype frequencies defined by next generation sequencing in a population of East Croatia blood donors. *Sci Rep*. 2020;10(1):5513.
252. Fichou Y, Audrézet MP, Guéguen P, Le Maréchal C, Férec C. Next-generation sequencing is a credible strategy for blood group genotyping. *Br J Haematol*. 2014;167(4):554-562.
253. Mueller A, Fischer K, Suluku R, Hoenen T. Sequencing of mRNA from whole blood using nanopore sequencing. *J Vis Exp*. 2019;148, e59377.

- 
254. Chou ST, Flanagan JM, Vege S, Luban NLC, Brown RC, Ware RE, Westhoff CM. Whole-exome sequencing for *RH* genotyping and alloimmunization risk in children with sickle cell anemia. *Blood Adv.* 2017;1(18):1414-1422.
255. Lane WJ, Westhoff CM, Gleadall NS, Aguad M, Smeland-Wagman R, Vege S, Simmons DP, Mah HH, Lebo MS, Walter K, Soranzo N, Di Angelantonio E, Danesh J, Roberts DJ, Watkins NA, Ouwehand WH, Butterworth AS, Kaufman RM, Rehm HL, Silberstein LE, Green RC; MedSeq Project. Automated typing of red blood cell and platelet antigens: a whole-genome sequencing study. *Lancet Haematol.* 2018;5(6):e241-e251.
256. Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015;13(5):278-289.
257. von Zabern I, Wagner FF, Moulds JM, Moulds JJ, Flegel WA. D category IV: a group of clinically relevant and phylogenetically diverse partial D. *Transfusion.* 2013;53(11 Suppl 2):2960-2973.

## 8. SAŽETAK

Antigen D je izraziti imunogen, najjači poslije antigena A i B. Može izazvati stvaranje protutijela anti-D ako ga imunosni sustav RhD negativne osobe prepozna kao strani antigen nakon transfuzije krvi, trudnoće ili transplantacije organa i tkiva. Neke D-varijante, pogotovo one kodirane hibridnim alelima, u rutinskim serološkim testovima za određivanje antigena D mogu biti lažno negativne. Uzroci su te pojave smanjenje broja antigena D na membrani eritrocita ili nedovoljna količina epitopa RhD u antigenima D kodiranim hibridnim alelima. Iako u tim testovima reagiraju negativno, D-varijante mogu imunizirati RhD negativne osobe. Navedeni klinički razlozi i ubrzan razvoj molekularne dijagnostike u posljednjih desetak godina, posebno alela sustava Rh, potaknuli su transfuzijske centre da sve više provode neki oblik molekularnog probira za gen *RHD* u RhD negativnih davatelja krvi. Ciljevi ovog istraživanja bili su opisati varijante *RHD* u populaciji RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske, njihovu učestalost i haplotipove s genom *RHCE*, objasniti proturječne rezultate seroloških i molekularnih metoda te predložiti algoritam za rutinsko testiranje alela sustava Rh u davatelja krvi.

U dvogodišnjem prospektivnom istraživanju sudjelovalo je 704 nesrodnih dobrovoljnih davatelja krvi stanovnika Međimurske i Varaždinske županije. Svi ispitanici bili su serološki RhD negativni i pojedinačno su testirani na prisutnost egzona gena *RHD*.

Od 704 serološki RhD negativnih ispitanika, njih 589 (83,7 %) fenotipa ccee bilo je negativno za egzone *RHD* 3, 5, i 10 u probirnom testiranju te su proglašeni *RHD* negativnima (delecija *RHD*). U ostalih 115 ispitanika (16,3 %) metodom PCR u stvarnom vremenu potvrđen je serološki nalaz Rh-fenotipa (C+ i/ili E+). I u toj je skupini 112 ispitanika bilo potvrđeno *RHD* negativno jer nije utvrđena reaktivnost ni za koji egzon gena *RHD*. U dva ispitanika (0,28 %) fenotipa Ccee pronađene su DEL aleli gena *RHD*, *RHD\*DEL44* (strukture *RHD\*D-CE(4-9)-D*) i *RHD\*DEL32* (s promjenom jedne baze u intronu 1, c.149-29G>C). Jedan ispitanik (0,14 %) potvrđen je kao homozigot za deleciju gena *RHD*, ali je pokazivao određenu sekvencu gena *RHD* u 5'UTR lokusa *RHCE*, c.-132A. Radi se o podtipu alela *RHCE\*02*, hibridnom alelu strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*.

U sva tri ispitanika s varijantama gena sustava Rh testom adsorpcije i elucije dokazana je prisutnost antigena D ili epitopa RhD. Učestalost svakog alela sustava Rh u populaciji RhD negativnih davatelja iznosi 0,07 % ili 1 : 1408 (95 %-tni interval pouzdanosti 1 : 55608 – 1 : 253).

Ovim su istraživanjem po prvi put u Hrvatskoj opisani DEL aleli *RHD*. Prema podacima iz literature, ovo je prvi put da se u populaciji izvan Kine, a posebno u jednoj populaciji europskog porijekla, dokazala ekspresija DEL fenotipa alela *RHD\*DEL44*. Hibridni alel strukture *RHCE\*D-CE(2-10)* dosad je opisan u Kini i u Sloveniji. U ovom je istraživanju prvi put kod osobe bez lokusa *RHD* i s tim hibridnim alelom dokazana prisutnost epitopa RhD. S obzirom na zemljopisnu blizinu slovenskih slučajeva, moguće je postojanje lokalnog bazena tog alela. Primjena novih metoda NGS u imunohematologiji u bliskoj budućnosti, pogotovo pristupa SMRT, sekvenciranja jedne molekule DNA, mogla bi pokazati vezu između strukture alela i pozitivnog rezultata za epitop ili epitope RhD u uzorku ovog ispitanika.

Na temelju plana istraživanja i njegovih rezultata predložen je algoritam za uvođenje molekularnog određivanja alela sustava Rh u davatelja krvi u Hrvatskoj. Molekularno testiranje davatelja krvi omogućit će sigurniju primjenu krvnih pripravaka te spriječiti neželjenu imunizaciju pacijenata koji su doista RhD negativni RhD pozitivnom dozom krvi koja je u serološkom testiranju reagirala neaktivno.

## 9. SUMMARY

D antigen is highly immunogenic, the highest after A and B antigens. It can induce anti-D antibody production if it is recognized as foreign by the immune system of an RhD negative person due to transfusion, pregnancy or transplantation. Some D variants, especially those expressed by hybrid alleles, can react falsely negative in routine serology tests for D antigen determination. False reactivity could be caused by the lower number of D antigens on erythrocyte membrane or not enough D epitopes within the products of hybrid Rh alleles. Irrespective of the cause of the negative serological reaction, D variants can immunize RhD negative individuals. These clinical reasons and accelerating development of molecular diagnostics in the last decade, most notably for Rh alleles, prompted an increasing number of institutes for transfusion medicine to implement a method of molecular screening for *RHD* in RhD negative blood donors. Aims of this study were to report and describe *RHD* variants in RhD negative blood donors of northwestern Croatia, their frequencies and haplotypes with *RHCE*, interpret the discordant serology and molecular results as well as to propose the algorithm for routine Rh alleles testing implementation.

In this two-year prospective study, the participants were 704 unrelated voluntary blood donors from Međimurje and Varaždin County in northwestern part of Croatia. All blood donors were serologically RhD negative and were individually tested for *RHD* exons. *RHD* screening was performed by examination of *RHD* exons 3, 5 and 10 in 589/704 (83.7%) serologically RhD negative ccee samples. *RHD* deletion was established in all of them. Serology results of the Rh phenotype (C+ and/or E+) were confirmed by qPCR in the remaining 115 participants (16.3%). In this group, 112 donors were confirmed as *RHD* negative as well, because none of the *RHD* exons were reactive. *RHD* DEL alleles were determined in two Ccee donors (0.28%): *RHD\*DEL32* (with single nucleotide polymorphism in intron 1, c.149-29G>C) and *RHD\*DEL44* (of structure *RHD\*D-CE(4-9)-D*). One participant (0.14%) was proven as homozygous for *RHD* deletion, but simultaneously revealed one distinct *RHD* sequence in 5'UTR within *RHCE* locus, c.-132A. It was detected in a hybrid allele with genomic structure *RHCE\*D-CE(2-10)*, a subtype of *RHCE\*02* allele.

All three donors with Rh variants expressed D antigens or RhD epitopes as displayed by the adsorption and elution test. The frequency of each Rh allele in RhD negative blood donors is 0.07% or 1:1408 (95% confidence interval 1:55608 – 1:253).

The *RHD* DEL alleles were proven for the first time in this study in a Croatian population. According to the published literature, this study was the first outside China to report a DEL phenotype of the antigen expressed by the allele *RHD\*DEL44*, and particularly in a population of European origin. Hybrid allele *RHCE\*D-CE(2-10)* has been described previously in China and Slovenia. This study demonstrated for the first time the presence of an RhD epitope or epitopes in a donor with homozygous *RHD* deletion containing this hybrid allele. Considering the proximity with the reported cases of the allele from the neighbouring Slovenia, it is plausible, that there could be a local basin of this hybrid allele. As the new NGS methods have been penetrating the field of immunohematology recently, with SMRT sequencing especially seeming encouraging for the near future, they could connect the complete genomic structure of the allele with the verified RhD epitope(s) in this particular sample from this study.

The study plan and its results laid the foundation of the algorithm for implementation of Rh molecular testing within the blood donors in Croatia. Molecular Rh testing of the blood donors will provide more safety for patients who receive their blood products. Additionally, this would prevent the immunization of genuine RhD negative patients by an RhD positive unit, which reacted negatively in serological testing.

## 10. PRILOZI

Prilog 1. Interpretacijska tablica za test RBC-FluoGene D-Screen.

Jažice	Specifičnost	SNV	Položaj u RHD	Aminokiselina	Nazivi alela (ISBT)	Fenotip (ISBT)	Fluorokrom specifične reakcije	Fluorokrom interne kontrole
B1,B2,B3, B4,B5,B6 i F1,F2,F3, F4,F5,F6	Egzon 10 RHD	c.*105A	3'UTR	-	RHD*01 (i varijante RHD) ili RHD*01N.01	RH:1 (D) ili RhD negativan	1	3
	Egzon 3 RHD Egzon 5 RHD	c.455A c.676G c.787G	Egzon 3 Egzon 5 Egzon 5	Ile172 Ala226 Gly263			2	

Prilog 2. Interpretacijska tablica za test RBC-FluoGene CDE eXtend. (1/5)

Gen sustava Rh	Reakcija	Jažice	Specifičnost	SNV	Naziv alela (ISBT)	Fenotip (ISBT)	Fluorokrom specifične reakcije	Fluorokrom interne kontrole
RHCE	c-1 c-2 <sup>a</sup>	F1, F3	c	c.201A c.307C	RHCE*01 (RHCE*ce) RHCE*03 (RHCE*cE)	RH:4 (c)	2	3
	C-1 C-2	G1, G3	C	i2-109 bp ins	RHCE*02 (RHCE*Ce) RHCE*04 (RHCE*CE)	RH:2 (C)	1	3
	Cw-1 Cw-2	E1, E3	C <sup>w</sup>	(c.-132G) c.122A>G	RHCE*02.08.01 (RHCE*Ce.08.01, RHCE*CeCW), RHCE*02.08.02 (RHCE*Ce.08.02, RHCE*CeNR)	RH:8 (C <sup>w</sup> +) )	2	3
	e-1 e-2 <sup>b</sup>	F1, F3	e	c.676G (c.787A)	RHCE*01 (RHCE*ce) RHCE*02 (RHCE*Ce)	RH:5 (e)	1	3
	E-1 E-2 <sup>c</sup>	G1, G3	E	c.676G>C (c.787A)	RHCE*03 (RHCE*cE) RHCE*04 (RHCE*CE)	RH:3 (E)	2	3
	1006T <sup>e</sup>	B4	RHCE-1006T	(c.940 -159T) c.1006G>T	RHCE*01.20.03 (RHCE*ce.20.03, RHCE*ceVS.03) RHCE*01.20.05 (RHCE*ce.20.05, RHCE*ceVS.05)	Parcijalni e, parcijalni c, RH:- 10,20 (V-VS+), RH:-31 (hrB-)	1	2
	48C	A4	RHCE-48C	c.48G>C	RHCE*02 (RHCE*Ce) svi RHCE*04 (RHCE*CE) svi RHCE*01.01, .02.01, .02.02, .04.01-.03, .05.01, .0701, .08, .09, .10.01, .12, .16, .20.02-04, .20.08-.10, .21.02 RHCE*03.18	Ce RH:2 (C), RH:5 (e), RH:7 (rh <sub>i</sub> (Ce)) CE RH:2 (C), RH:3 (E), RH:22 (CE) c+ e+, parcijalni c parcijalni e ili nije testirano c+ E+	1	3
	48G	E4	RHCE-48G	c.48G	RHCE*03 (RHCE*cE) svi osim *03.18 RHCE*01.03, .06.01-06, .05, .07.02, .10.02, .11, .13-.15, .20.01, .20.05, .20.07, .21.01, .22-39, .01N.01-05, .03.01-03, .03.02, .04-14, .15.01-02, .16, .17, .19, .20, .21.01, .22-.39	cE RH:4 (c), RH:3 (E), RH:27 (cE) Parcijalni e parcijalni c ili nije testirano	1	2



## Prilog 2. Interpretacijska tablica za test RBC-FluoGene CDE eXtend. (2/5)

Gen sustava Rh	Reakcija	Jažice	Specifičnost	SNV	Naziv alela (ISBT)	Fenotip (ISBT)	Fluorokrom specifične reakcije	Fluorokrom interne kontrole
<b>RHCE</b>	733G-1 733G-2 <sup>d</sup>	A3, A4	<b>RHCE-733G</b>	c.733C>G (c.801 +170G)	<i>RHCE*01.04.01</i> ( <i>RHCE*ce.04.01</i> )	RH:10,-20(V+ <sup>w</sup> VS-), RH:-19 (hrS-), parcijalni e, pacijalni c	2	3
					<i>RHCE*01.04.02</i> ( <i>RHCE*ce.04.02</i> )	parcijalni e		
					<i>RHCE*01.04.03</i> ( <i>RHCE*ce.04.03</i> )	(ce)		
					<i>RHCE*01.06.02/03</i> ( <i>RHCE*ce.06.02/03</i> )	(ce)		
					<i>RHCE*01.20.01</i> ( <i>RHCE*ce.20.01</i> )	Parcijalni e, parcijalni c, RH:10,20 (V+VS+), RH: 31 slabi do negativan (hrB+ <sup>w/w</sup> )		
					<i>RHCE*01.20.02</i> ( <i>RHCE*ce.20.02</i> )	Parcijalni e, parcijalni c, RH:10, 20 (V+VS+), RH:-31(hrB-)		
					<i>RHCE*01.20.03</i> ( <i>RHCE*ce.20.03</i> )	Parcijalni e, parcijalni c, RH: -10,20 (V-VS+), RH:-31(hrB-)		
					<i>RHCE*01.20.04</i> ( <i>RHCE*ce.20.04</i> )	Parcijalni e, RH:10, 20 (V+ VS+), vjerojatni RH:-31 (hrB-)		
					<i>RHCE*01.20.05</i> ( <i>RHCE*ce.20.05</i> )	Parcijalni e, RH:-10, 20 (V- VS+), RH:-31		
					<i>RHCE*01.20.06</i> ( <i>RHCE*ce.20.06</i> )	Parcijalni c, parcijalni e, RH:43 (Crawford+), RH:20 (VS+), RH:-19,-31, RH:-58 (CELO-) umjereno do jako reaktivan s nekim monoklonskim anti-D		
					<i>RHCE*01.20.07</i> ( <i>RHCE*ce.20.07</i> )	Parcijalni e, parcijalni c, RH:48 (JAL+), RH:-57 (CEST-), RH:20 (V/VS+ <sup>w</sup> ), RH:19 (hrS+ <sup>w/w</sup> ), RH:31 (hrB+ <sup>w/w</sup> )		
					<i>RHCE*01.20.08</i> ( <i>RHCE*ce.20.08</i> )	e+ <sup>w</sup> , RH:10,20 (V+VS+), vjerojatni RH:-31 (hrB-)		
					<i>RHCE*01.20.09</i> ( <i>RHCE*ce.20.09</i> )	e+ <sup>w</sup> , RH:-10,20 (V-VS+), RH:31 (hrB+ <sup>w</sup> )		
					<i>RHCE*01.20.10</i> ( <i>RHCE*ce.20.10</i> )	Vjerojatni parcijalni e i parcijalni c		
					<i>RHCE*01.22</i> ( <i>RHCE*ce.22</i> )	e+ <sup>w</sup> , jaki D+ s nekim monoklonskim anti-D, RH:33 (DHAR+), RH:50 (FPPT+)		
<i>RHCE*01.37</i> ( <i>RHCE*ce.37</i> )	c+ e+							
<i>RHCE*02.04</i> ( <i>RHCE*Ce.04</i> )	Parcijalni C+							
<i>RHCE*02.30</i> ( <i>RHCE*Ce.30</i> )	C+ e+ V+VS+							
<i>RHCE*03.03.02</i> ( <i>RHCE*cE.03.02</i> )	Parcijalni E, E+/-							
<b>RHD</b>	D-Ex1 <sup>f</sup>	D2	Egzon 1 <i>RHD</i>	c.-132A	<i>RHD*01</i> sram <i>RHD*01N.01</i>	RH:1 (D) sram D-	1	3
	D-Ex2 <sup>g</sup>	G2	Egzon 2 <i>RHD</i>	c.201G c.307T			2	3
	D-Ex3 <sup>h</sup>	F2	Egzon 3 <i>RHD</i>	c.455A			1	2
	D-Ex4-1 <sup>i</sup> D-Ex4-2 <sup>i</sup>	E2, H2	Egzon 4 <i>RHD</i>	c.514A c.602C			2	3
	D-Ex5-1 <sup>j</sup> D-Ex5-2 <sup>j</sup>	A2, D2	Egzon 5 <i>RHD</i>	c.676G c.787G			2	3
	D-Ex6 <sup>k</sup>	C2	Egzon 6 <i>RHD</i>	(c.826G) c.916G			1	2
	D-Ex7 <sup>l</sup>	B2	Egzon 7 <i>RHD</i>	c.1048G			1	2
	D-Ex9 <sup>m</sup>	G2	Egzon 9 <i>RHD</i>	c.1193A			1	3
	D-Ex10 <sup>n</sup>	A2	Egzon 10 <i>RHD</i>	c.*105A			1	3
	D-psi-1 D-psi-2	E1, E3	<i>RHD</i> psi	c.486-37bp ins (c.602C)			<i>RHD*08N.01</i> ( <i>RHD*Pseudogene</i> , <i>RHD*Ψ</i> )	D-

Prilog 2. Interpretacijska tablica za test RBC-FluoGene CDE eXtend. (3/5)

Gen sustava Rh	Reakcija	Jažice	Specifičnost	SNV	Naziv alela (ISBT)	Fenotip (ISBT)	Fluorokrom specifične reakcije	Fluorokrom interne kontrole
RHD	697A	A1	RHD-697A	c.697G>A (c.787G)	RHD*05.05 (RHD*DV.05) RHD*10.04 (RHD*DAU4)	DV tip 5 DAU4	2	3
	697C-1 697C-2 °	D1, D3	RHD-697C	c.697G>C (c.787G)	RHD*05.01/.03/.04/.06/ .07/.08/.09 (RHD*DV.1/.3/.4/.6/.7/.8/.9) RHD*09.02.00/.01 (RHD*DAR2.00/.01) RHD*10.05/10.05.01 (RHD*DAU5/DAU5.01) RHD*13.02 (RHD*DBS2) RHD*16.03 (RHD*DCS3)	DV tip 1/3/4/6/7/8/9 DAR2 (DARE) / DAR2.1 DAU5 / DAU5.1 DBS2 DCS-3	2	3
	DHMi-1 DHMi-2		RHD-DHMi	c.848C>T (c.916G)	RHD*19 (RHD*DHMi)	DHMi	1	
	DNB	A1	RHD-DNB	(c.968C) c.1063G>A	RHD*25 (RHD*DNB)	DNB	1	3
	DcatVii-1	C1, C3	RHD-catVII	(c.201G) c.329T>C	RHD*07.01/.02 (RHD*DVII.1/.2)	DVII / DVII tip 2	1	2
	D-1136C-1 D-1136C-2	E2, H2	RHD-non-DAU	c.1136C	Svi aleli RHD osim RHD*10.00-15/01N.69	Različiti fenotipovi	1	3
	DAU-1 DAU-2	B1, B3	RHD-DAU0	c.1136C>T	RHD*10.00/.00.01/.00.02/ .01/.02/.03/.04/.05/.05.01/ .06/.07/.08/.09/.10/.11/ .12/.13/.14/.15 RHD*01N.69	DAU0/0.1/0.2/1/2/3/4/5/5.1 /6/7/8/9/10/11/12/13/14/15 D-	1	3
	689T-1 689T-2		RHD-DAU1	c.689G>T	RHD*10.01	DAU1	2	
	998A	H3	RHD-DAU2	c.998G>A	RHD*10.02/.06/.07	DAU2/DAU6/DAU7	2	3
	835A		RHD-DAU3	c.835G>A	RHD*10.03/.07/.11	DAU3/DAU7/DAU11	1	
	186T	F4	RHD-DIIa/IVa	c.186G>T	RHD*03.01.04.09 / 03N.01/ 04.01.01.02 / 40	DIIa, DIII tip 4, 9 / D- C+ / DIVa, DIVa tip 3 / D-SPM	1	2
	410T-1 410T-2	G4, H4	RHD-DIIa/IVa	c.410C>T	RHD*03.01.04.04.02.06-09 / 03N.01 / 04.01.01.02 / 12.03.04 / 40	DIIa, DIII tip 4,7,8,9 / D- C+ / DIVa, DIVa tip 3 / DOL3, DOL4 / D-SPM	1	3
	1048C-1 1048C-2		RHD-DIVa	c.1048G>C	RHD*04.01.01.02	DIVa, DIVa tip 3	2	
	D-(Ces)-1 <sup>p</sup> D-(Ces)-2 <sup>p</sup>	C4, D4	RHD*DIIa- CEVS(4-7)-D	intron 3	RHD*03N.01	D- C+	2	3
	eXt-D-RHD*01W.1 - c.809T>G	A6	weak D type 1	c.809T>G	RHD*01W.1/1.1/1.2 (RHD*weak D type 1/1.1/1.2) RHD*62	Slabi D tip 1/1.1/1.2 DNT (V270G)	1	2
	eXt-D-RHD*01W.2 - c.1154G>C-1,-2 <sup>a</sup>	A5, B6	weak D type 2	c.1154G>C	RHD*01W.2/2.1/2.2 (RHD*weak D type 2/2.1/2.2)	Slabi D tip 2/2.1/2.2	1	3
	eXt-D-RHD*01W.3 - c.8C>G	B5	weak D type 3	c.8C>G	RHD*01W.3/3.1 (RHD* weak D type 3/3.1)	Slabi D tip 3/3.1	2	3
	eXt-D-RHD*09.01 - c.1025T>C	C6	weak D type 4.2.1/2	c.1025T>C	RHD*09.01/01.01/01.02/01.03 (RHD*DAR/DAR1.01/1.02 /1.03)	DAR (T203A)/DAR1.1/1.2/1.3 (slabi D 4.2.1/4.2.2/4.2.3)	2	3
					RHD*09.02.00/.01 (RHD*DAR2.00/.01)	DAR2 (DARE)/DAR2.1		
					RHD*09.06 (RHD*DAR6)	DAR6		
					RHD*01W.29 (RHD* weak D type 29)	Slabi D tip 29		
	eXt-D-non- RHD*09.01-c.1025T <sup>a</sup>	C5	non-weak D type 4.2.1/2	c.1025T	Svi aleli RHD osim RHD*04.03, *04.05, *09.01, *09.01.00 (= weak D 4.2), *09.01.01-03, *09.02.00-01, *09.06, *14.01, *14.02, *41, *58, *01N.02-07, *03N.01, *01N.42, *01W.29, *01EL.23, *01EL.44, *01EL.45, *01N.01	Različiti fenotipovi	2	3
	eXt-D- RHD*09.01.01- c.957G>A -c.1025T>C	D6	weak D type 4.2.1/4.2.2	c.957G>A c.1025T>C	RHD*09.01/01.01/01.02 (RHD*DAR/DAR1.01/1.02)	DAR (T203A)/DAR1.1/1.2 (slabi D 4.2.1/4.2.2)	2	3
					RHD*09.02.00/.01 (RHD*DAR2.00/.01)	DAR2 (DARE)/DAR2.1		
					RHD*01W.29 (RHD* weak D type 29)	Slabi D tip 29		

Prilog 2. Interpretacijska tablica za test RBC-FluoGene CDE eXtend. (4/5)

Gen sustava Rh	Reakcija	Jažice	Specifičnost	SNV	Naziv alela (ISBT)	Fenotip (ISBT)	Fluorokrom specifične reakcije	Fluorokrom interne kontrole
<b>RHD</b>	eXt-D-RHD*09-c.602C>G-c.514A	C5	weak D type 4.0/4.1/4.2.1/4.2.2/DAR (weak D type 4.2)/4.3 /14	c.602C>G (c.514A)	RHD*09.01/01.00/01.01/01.02/01.03 (RHD*DAR/DAR1.00/1.01/1.02/1.03)	DAR (T203A)/ DAR1/1.1/1.2/1.3 (slabi D 4.2/4.2.1/4.2.2/4.2.3)	1	3
					RHD*09.02.00/01 (RHD*DAR2.00/01)	DAR2 (DARE)/DAR2.1		
					RHD*09.03/03.01 (RHD*DAR3/3.01)	DAR3/3.1 (slabi parcijalni D 4.0.1/4.0)		
					RHD*09.04/05/06 (RHD*DAR4/5/6)	DAR4/5/6 (slabi D 4.1/4.3 ili DEL/DAR(CE2:V50V-S68N))		
					RHD*03.01/06/07 (RHD*DIIIa/DIII.06/07)	DIIIa/DIII tip 6/7		
					RHD*01W.14 (RHD*weak D type 14)	Slabi D tip 14		
					RHD*01W.40/51 (RHD*weak D type 40/51)	Slabi D tipovi 40/51		
					RHD*01N.72	D-		
	eXt-D-RHD*09-c.602C>G-c.544T	C6	weak D type 4.0/4.1/4.2.1/4.2.2/DAR (weak D type 4.2)/4.3	c.602C>G (c.544T)	RHD*09.01/01.00/01.01/01.02/01.03 (RHD*DAR/DAR1.00/1.01/1.02/1.03)	DAR(T203A)/ DAR1/1.1/1.2/1.3 (slabi D 4.2/4.2.1/4.2.2/4.2.3)	1	3
					RHD*09.02.00/01 (RHD*DAR2.00/01)	DAR2 (DARE)/DAR2.1		
					RHD*09.03/03.01 (RHD*DAR3/3.01)	DAR3/3.1 (slabi parcijalni 4.0.1/4.0)		
					RHD*09.04/05/06 (RHD*DAR4/5/6)	DAR4/5/6 (slabi D 4.1/4.3 ili DEL/DAR(CE2:V50V-S68N))		
					RHD*03.01/06/07 (RHD*DIIIa/DIII.06/07)	DIIIa/DIII tip 6/7		
					RHD*01W.40/51 (RHD*weak D type 40/51)	Slabi D tipovi 40/51		
					RHD*01N.72	D-		
					eXt-D-RHD*09.04-c.48G>C-1, -2	A5, B6		
	RHD*01.01 (DUC-3)	Standardni D						
	RHD*10.13 (RHD*DAU13)	DAU13						
	eXt-D-non-RHD*09.04-c.48G	E5	non-weak D type 4.1	c.48G	Svi aleli RHD osim RHD*01.01, *09.04 (RHD*DAR4), *10.13 (*DAU13), *01N.02, *01N.08, *01N.43, *01N.42, *01N.01	Različiti fenotipovi	2	3
	eXt-D-RHD*09.05-c.872C>G	D6	RHD*09.05	c.872C>G	RHD*09.05 (RHD*DAR5)	DAR5	1	3
RHD*01EL.41 (RHD*DEL41)					DEL			
eXt-D-non-RHD*09.05-c.872C <sup>s</sup>	B5	non-RHD*09.05	c.872C	Svi aleli RHD osim RHD*09.05 (*DAR5), RHD*01EL.41, RHD*04.03, *05.10, *06.02, *06.03.01, *06.03.02, *14.01, *14.02, *41, *46, *03N.01, *01N.02-07, *01W.2.2, *01W.66, *01EL.23, *01EL.44, *01N.01	Različiti fenotipovi	1	3	
eXt-D-RHD*01W.5-c.446C>A	D5	weak D type 5	c.446C>A	RHD*01W.5 (RHD*weak D type 5)	Slabi D tip 5	1	2	
eXt-D-RHD*11-c.885G>T	E5	weak D type 11	c.885G>T	RHD*11 (RHD*weak partial 11)	Slabi parcijalni tip 11 (DEL)	1	3	
eXt-D-RHD*15-c.845G>A-1, -2	F5, E6	weak D type 15	c.845G>A	RHD*15 (RHD*weak partial 15)	Slabi parcijalni tip 15	1	2	
eXt-D-RHD*01W.17-c.340C>T <sup>t</sup>	H5, F6	weak D type 17	c.340C>T	RHD*01W.17 (RHD*weak D type 17)	Slabi D tip 17	2	3	
				RHD*10.08 (RHD*DAU8)	DAU8			
eXt-D-RHD*01W.59-c.1148T>C	H5, F6	weak D type 59	c.1148T>C	RHD*01W.59 (RHD*weak D type 59)	Slabi D tip 59	1	3	
eXt-D-RHD*DEL1-c.1227G>A	G6	K409K	c.1227G>A	RHD*01EL.01/36 (RHD*DEL1/36)	DEL	1	2	
eXt-D-RHD*DEL8-c.486+1G>A-1, -2	G5, H6	IVS3+1G>A	c.486+1G>A	RHD*01EL.08 (RHD*DEL8)	DEL	1	2	

## Prilog 2. Interpretacijska tablica za test RBC-FluoGene CDE eXtend. (5/5)

<b>a: c-1, c-2</b>	Ove reakcije pokazuju križnu reaktivnost s <i>RHD*03.02(DIIIb)</i> , <i>*03.07(DIII.07)</i> i <i>*45(DKK)</i> .
<b>b: e-1, e-2</b>	Ove reakcije pokazuju križnu reaktivnost s <i>RHD*01W.100/*05.02/.07/.10</i> (DV.2/.7/.10), <i>*06.02/.03/.04</i> (DVI.2/.3/.4), <i>*14.01/.02</i> (DBT1/2) i <i>*46</i> (DLX). Uz sljedeće alele reaktivnost za antigen e može biti negativna zbog promjena na mjestu vezanja početnica: <i>RHCE*01.04.01</i> (ceAR), <i>*01.04.02/03</i> (ceAR+), <i>*01.05.01</i> (ceEK), <i>*01.22</i> (ceHAR) i <i>*02.04</i> (CeVA).
<b>c: E-1, E-2</b>	Ove reakcije pokazuju križnu reaktivnost s <i>RHD*06.01</i> (DVI.1), <i>*13.01</i> (DBS1) i <i>*41</i> (DBU).
<b>d: RHCE-733G</b>	<p>Pozitivna reakcija u kombinaciji s reakcijom za antigen c upućuje na sljedeće alele: <i>RHCE*ce.04.01/.04.02/.04.03/.01.22</i>.</p> <p>Pozitivna reakcija u kombinaciji s reakcijom za antigene c i e upućuje na sljedeće alele: <i>RHCE*ce.06.02/.06.03/.VS.01/.VS.02/.VS.04/.VS.06/.VS.07/.VS.08/.VS.09/.VS.10/.37/*ce.03.02</i>.</p> <p>Pozitivna reakcija u kombinaciji s reakcijom za antigene C i e upućuje na <i>RHCE*Ce.30</i>.</p> <p>Pozitivna reakcija u kombinaciji s reakcijom za antigene c i e te polimorfizam c.1006T upućuje na sljedeće alele: <i>RHCE*ce.VS.03/.VS.05</i>.</p> <p>U rijetkim situacijama (<i>RHCE*02.04</i>, <i>*01.22</i>, <i>*01.04.01</i>) ova reakcija može dati slabo pozitivan signal. Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHD*01N.06</i> i <i>RHD*03N.01</i> te vjerojatno s <i>RHD*DIV.3</i>.</p> <p>Zbog haplotipske povezanosti ova reakcija može se činiti pozitivnom u slučaju slabog D tipa 4. Izvori: Ouchari M et al. RHD*weak partial 4.0 is associated with an altered RHCE*ce(48C, 105T, 733G, 744C, 1025T) allele in the Tunisian population. <i>Transfus Med.</i> 2013;23(4):245-249.</p> <p>Fichou Y, Maréchal CL, Férec C. The RHD*weak D type 4.0 allele is predominantly but not exclusively cis-associated with the altered RHCE*ce(c.48C, c.105T, c.733G, c.744C, c.1025T) allele in the French population. <i>Transfus Med.</i> 2014;24(2):120-122.</p> <p>Prisco Armoni C et al. RHCE variants inherited with altered RHD alleles in Brazilian blood donors. <i>Transfus Med.</i> 2016;26(4):285-290.</p>
<b>e: CE-1006T</b>	<p>Pozitivna reakcija u kombinaciji s reakcijom za antigene c i e te polimorfizam c.733G upućuje na sljedeće alele: <i>RHCE*ce.VS.03/.VS.05</i>.</p> <p>Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHD*01N.06</i> i <i>*03N.01</i>.</p>
<b>f: D-Ex1</b>	Reaktivnost je upitna za sljedeće hibridne alele: <i>RHD*01N.42</i> , <i>*01N.43</i> , <i>RHCE*03.02</i> .
<b>g: D-Ex2</b>	Ovi SNV-ovi su pozitivni i uz prisutnost antigena C. U slučaju <i>RHD</i> negativnog i C-pozitivnog uzorka, ova je reakcija pozitivna. Za sljedeće alele nejasna je reaktivnost: <i>RHD*03.04.02</i> , <i>*07.02</i> , <i>*39</i> , <i>*01N.42</i> . Reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.02.02</i> i <i>*03.02</i> .
<b>h: D-Ex3</b>	Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.04.03</i> / <i>*02.10.02</i> i <i>*03.02</i> . Za sljedeći alel nejasna je reaktivnost: <i>RHD*01N.42</i>
<b>i: D-Ex4-1, D-Ex4-2</b>	Ove reakcije mogu biti slabo pozitivne ili negativne s <i>RHD*47.01</i> (*DMI-1.1). Za sljedeći alel nejasna je reaktivnost: <i>RHD*01N.42</i> . Ove reakcije pokazuju križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.29</i> / <i>*01.34</i> i <i>*02.10</i> .
<b>j: D-Ex5</b>	Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.22</i> / <i>*01.29</i> / <i>*01.34</i> / <i>*02.04</i> . Za sljedeće alele nejasna je reaktivnost: <i>RHD*03.01/06/07</i> / <i>*04.01.02</i> / <i>*05.01/03/06/08</i> / <i>*09.01-06</i> / <i>*10.05</i> / <i>*12.03/04</i> / <i>*01N.42</i> / <i>*01N.72</i> / <i>*01W.29</i> ; <i>RHCE*01.04.01</i> / <i>01.04.02</i> / <i>*01.04.03</i> / <i>*01.05.01</i> .
<b>k: D-Ex6</b>	Ova reakcija može biti slabo pozitivna ili negativna uz <i>RHD*11</i> (weak partial 11), <i>*01W.08</i> (weak D type 8), <i>*01W.55</i> (weak D type 55). Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.04.01</i> / <i>*01.04.02</i> / <i>*01.04.03</i> / <i>*01.29</i> / <i>*01.34</i> i <i>*02.08.02</i> .
<b>l: D-Ex7</b>	Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.29</i> / <i>*01.34</i> i <i>*02.08.02</i> .
<b>m: D-Ex9</b>	Ova reakcija može biti slabo pozitivna ili negativna uz <i>RHD*01W.2/2.1/2.2</i> (weak D type 2/2.1/2.2). Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.29</i> i <i>*02.08.02</i> . Za sljedeći alel nejasna je reaktivnost: <i>RHCE*01.16</i> .
<b>n: D-Ex10</b>	Za sljedeće alele nejasna je reaktivnost: <i>RHD*01N.42</i> , <i>RHCE*02.08.02</i> .
<b>o: 697C-1, 697C-2</b>	Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.04.01/03</i> i <i>RHCE*01.05.01</i> .
<b>p: D(Ces)-1, D(Ces)-2</b>	Uz pozitivnu reakciju ne mogu se isključiti sljedeći rijetki aleli: <i>RHD*01EL.44/*01N.06,07/06.01,02/17.02</i> .
<b>q: eXt-D-RHD*01W.2-c.1154G&gt;C-1, -2</b>	Ova reakcija vjerojatno pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.27</i> .
<b>r: eXt-D-non-RHD*09.01-c.1025T</b>	Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.29</i> , <i>*01.34</i> , <i>*02.08.02</i> , <i>*02N.07</i> , <i>*02N.08</i> .
<b>s: eXt-D-non-RHD*09.05-c.872C</b>	Ova reakcija pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*01.04.01-03</i> , <i>*01.29</i> , <i>*01.34</i> , <i>*02.08.02</i> , <i>*02N.07</i> , <i>*02N.08</i> .
<b>t: eXt-D-RHD*01W.17-c.340C&gt;T</b>	Ova reakcija vjerojatno pokazuje križnu reaktivnost s <i>RHCE*ceVS.07</i> i <i>*Ce.01</i> .
<p><b>Savjeti za programsku interpretaciju</b></p> <p>Varijante s polimorfizmima izvan veznih mjesta početnica i proba ne mogu biti određene i zato pokazuju jednak uzorak reakcija kao i <i>RHD*01</i>. Zbog jasnoće program neće navesti alele koje karakteriziraju pozitivne i dodatna upitna reaktivnost za neki egzon <i>RHD</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• upitna reaktivnost za egzon 9 – <i>RHD*01N.58</i>, <i>RHD*01W.2/*01W.2.1</i> (*weak D type 2/2.1),</li> <li>• upitna reaktivnost za egzon 5 – <i>RHD*05.07</i> (<i>RHD*DV.07</i>), <i>RHD*08.01</i> (<i>RHD*DFV</i>),</li> <li>• upitna reaktivnost za egzon 1 – <i>RHD*01W.18</i> (*weak D type 18),</li> <li>• upitna reaktivnost za egzon 6 – <i>RHD*01W.55</i> (*weak D type 55),</li> <li>• upitna reaktivnost za egzon 4 – <i>RHD*01W.19</i> (*weak D type 19), <i>*47.01</i> (*DMI-1.1), <i>*17.04</i> (*DFR4).</li> </ul>	
<p><b>Važna uputa</b></p> <p>Neki rijetki aleli ovih sustava krvnih grupa nisu navedeni u ovoj tablici. Za više informacija pogledajte popis alela ISBT-a.</p>	
<p><b>Opća primjedba i ograničenje testa</b></p> <p>Ovim testom nije moguće razlikovati hibridne alele <i>RHD/CE</i> i delecije egzona <i>RHD</i>.</p>	

**Prilog 3.** Interpretacijska tablica testa RBC-Ready Gene Zygofast

Reakcija / jažica	1	2	3	4
Duljina amplikona (pb)	940	1525	935	1525
Specifičnost	Hibridni Rh-okvir	Hibridni Rh-okvir	Uzvodni Rh-okvir	Uzvodni Rh-okvir
Naziv alela (ISBT)	<i>RHD*01N.01</i>	<i>RHD*01N.01</i>	<i>RHD*01</i> ; varijante <i>RHD</i> s egzonom 1	<i>RHD*01</i> ; varijante <i>RHD</i> s egzonom 1
Fenotip (ISBT)	D-negativan	D-negativan	RH:1 (D)	RH:1 (D)
<b>Primjeri rezultata</b>				
<i>RHD*01N.01,*01N.01</i>	+	+	-	-
<i>RHD*01,*01N.01</i>	+	+	+	+
<i>RHD*01,*01</i>	-	-	+	+

## 11. POPIS KRATICA

- cDNA – kodirajuća deoksiribonukleinska kiselina (engl. *coding DNA*)  
 Ct-vrijednost – u qPCR-u, broj koji označava ciklus u kojem signal fluorescencije prelazi određeni prag intenziteta iznad pozadiskog šuma (engl. *cycle threshold*)  
 čl. – članak zakona  
 ddNTP (množina ddNTP-ovi) – dideoksiribonukleozid-trifosfat, nukleotidi bez hidroksilne skupine na 3'-C atomu deoksiriboze, pri sekvenciranju DNA zaustavljaju elongaciju lanca DNA  
 dNTP (množina dNTP-ovi) – deoksiribonukleozid-trifosfat – kratica kojom su zajednički obuhvaćena sva četiri gradivna nukleotida molekule DNA  
 EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)  
 HBV – virus hepatitisa B (engl. *hepatitis B virus*)  
 HCV – virus hepatitisa C (engl. *hepatitis C virus*)  
 HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)  
 kb – jedinica duljine sekvence – kilobaza, 1000 parova baza  
 mM – koncentracija 1/1000 mola po litri (milimol po litri)  
 mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger RNA*)  
 pb – jedinica duljine sekvence – parova baza  
 rcf – relativna centrifugalna sila (engl. *relative centrifugal force*), akceleracija centrifuge  
 RNaza A – nukleaza, enzim koji razgrađuje jednolančane RNA  
 rpm – okretaja po minuti (engl. *revolutions per minute*), jedinica brzine rotacije centrifuge  
 TAE pufer – pufer koji sadrži Tris, octenu kiselinu (acetat) i EDTA  
 TE pufer – pufer koji sadrži Tris i EDTA  
 U – jedinica za aktivnost Taq polimeraze – količina enzima koja katalizira umetanje 10 nmol deoksiribonukleotida u DNA za 30 min pri 74°C  
 UTR – rubne regije gena koje se ne prevode u protein (engl. *untranslated region*)

### POPIS KRATICA AMINOKISELINA

<b>G</b> Gly glicin	<b>P</b> Pro prolin
<b>A</b> Ala alanin	<b>V</b> Val valin
<b>L</b> Leu leucin	<b>I</b> Ile izoleucin
<b>M</b> Met metionin	<b>C</b> Cys cistein
<b>F</b> Phe fenilalanin	<b>Y</b> Tyr tirozin
<b>W</b> Trp triptofan	<b>H</b> His histidin
<b>K</b> Lys lizin	<b>R</b> Arg arginin
<b>Q</b> Gln glutamin	<b>N</b> Asn asparagin
<b>E</b> Glu glutaminska kiselina	<b>D</b> Asp asparaginska kiselina
<b>S</b> Ser serin	<b>T</b> Thr treonin

## 12. ŽIVOTOPIS

Marko Lilić rođen je 11. veljače 1979. godine u Varaždinu gdje je maturirao u Prvoj gimnaziji i Glazbenoj školi u Varaždinu (dva smjera, u dva odjela: glazbenik orguljaš i glazbenik pjevač). Završio je studij Biologije smjer Molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 2003. godine s temom “Molekularno istraživanje alela HLA razreda I u populaciji Hrvatske”. Diplomski rad izradio je u Zavodu za tipizaciju tkiva Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod mentorstvom prof. dr. sc. Vesne Kerhin-Brkljačić. Krajem 2003. i početkom 2004. godine volonterski je sudjelovao na projektu molekularne karakterizacije transkripcijskih faktora u razvoju limfocita T u Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu.

Od 2005. godine zaposlen je u tvrtki Jasika, kao voditelj programa, voditelj edukacija korisnika i aplikacijski stručnjak za dijagnostiku u područjima transplantacijske biologije, molekularne imunohematologije, serološke i molekularne mikrobiologije, dijagnostike neurobioloških markera degenerativnih bolesti te općenito metoda molekularne biologije. U travnju 2014. godine upisao je Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u suradnji sa Institutom Ruđer Bošković u Zagrebu i Sveučilištem u Dubrovniku.

Stručno surađuje s brojnim referentnim laboratorijima iz područja transplantacijske biologije i transfuzijske medicine u Hrvatskoj i susjednim zemljama. Aktivno je sudjelovao na brojnim znanstvenim i stručnim sastancima, kongresima i simpozijima iz područja stručnog interesa. Održao je nekoliko pozvanih predavanja u strukovnim društvima. Dosad je bio suautor u četiri znanstvena rada, od kojih u dva u časopisu s čimbenikom odjeka iznad medijana (Q2) i dopisni autor.

Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom, a pasivno talijanskim.

### ČLANSTVO U STRUKOVNIM UDRUGAMA

1. Europsko udruženje za imunogenetiku  
(European Federation for Immunogenetics, EFI)
2. Međunarodno udruženje za transfuziju krvi  
(International Society of Blood Transfusion, ISBT)
3. Udruga za unapređenje krvi i bioterapija  
(Association for the Advancement of Blood & Biotherapies, AABB)

## POPIS ZNANSTVENIH RADOVA

1. Jovanovic Srzentic S, Lilic M, Vavic N, Radovic I, Djilas I: Genotyping of eight human platelet antigen systems in Serbian blood donors: foundation for platelet apheresis registry. *Transfus Med Hemother.* 2021;48(4):228-233. doi: 10.1159/000514487
2. Guzijan G, Milosavić M, Radojković Sredić D, Lilić M, Jukić B. Molecular typing of RhD-negative blood donors with C and/or E antigen. *Scr Med.* 2019;50(2):98-101. doi: 10.5937/scriptamed50-22635
3. Guzijan G, Jovanovic Srzentic S, Pavlovic Jankovic N, Djilas I, Lilic M. Implementation of molecular *RHD* typing at two blood transfusion institutes from southeastern Europe. *Transfus Med Hemother.* 2019;46(2):114-120. doi: 10.1159/000496751.
4. Guzijan G, Lilić M, Jukić B, Milosavić M, Mitrović S. First results in genotyping for blood donors of the Republic of Srpska with serological weak D antigen. *Scr Med.* 2017;48(1):61-67. doi: 10.18575/msrs.sm.e.17.09

## USMENE PREZENTACIJE NA MEĐUNARODNIM SKUPOVIMA

1. Jovanović Srzentić S, Lilić M, Vavić N, Radović I, Đilas I. Genotyping of human platelet antigens as the contribution to contemporary transfusion treatment of blood components. Simpozij udruženja hematologa Republike Srpske s međunarodnim sudjelovanjem, Banja Luka, Bosna i Hercegovina, 4.12.2021.
2. Lilić M, Jaklin G, Gojčeta K, Raos M, Golubić Čepulić B. Molekularno određivanje alela *RHD* u populaciji RhD negativnih davatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske. *Liječ Vjesn.* 2021;143(Supl. 2):52-53. 8. hrvatski transfuziološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 5.11.2021.
3. Lilić M. Molekularna tipizacija eritrocitnih, leukocitnih i trombocitnih antigena, te detekcija antitrombocitnih antitijela, kao doprinos sigurnoj transfuziji. Simpozij iz kliničke transfuzijske medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 7.12.2018.
4. Knežević J, Nedić D, Primorac Marić A, Buntić Galić A, Lilić M. First report on allelic distribution of HLA loci obtained by sequence specific oligonucleotide typing for population of bone marrow registry donors in Bosnia and Herzegovina. 2. kongres hematologa i transfuziologa Bosne i Hercegovine s međunarodnim sudjelovanjem, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 28.10.2017.



**POSTERI / ABSTRAKTI NA DOMAĆIM I MEĐUNARODNIM SKUPOVIMA**

1. Čečuk-Jeličić E, Jaman S, Tarabene M, Dajak S, Lilić M. Važnost određivanja protutijela anti-HLA u transfuzijskoj medicini. [poster] *Liječ Vjesn.* 2021;143 Supl. 2:101-102. 8. hrvatski kongres transfuziologa s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 4.-7.11.2021.
2. Knežević J, Nedić D, Primorac Marić A, Buntić Galić A, Lilić M. First report on allelic distribution of HLA loci obtained by sequence-specific oligonucleotide typing for population of bone marrow registry donors in Bosnia and Herzegovina. [poster] *HLA.* 2017;89(6):444 P140 special issue doi:10.1111/tan.13036.  
31. europski kongres imunogenetike i tkivne podudarnosti, EFI 2017. Mannheim, Njemačka, 30.5-2.6.2017.
3. Jovanović Srzentić S, Dovč T, Rožman P, Andrić Z, Paunović M, Lilić M, Kosović S. DNB variant in a pregnant woman - first case report in Serbia. [poster] Abstract book, Ljubljana, Slovensko zdravniško društvo, Združenje za transfuzijsko medicino pri SZD, 2016;p.147. 5. slovenski kongres transfuzijske medicine s međunarodnim sudjelovanjem. Laško, Slovenija, 7-9.4.2016.

**POZVANA PREDAVANJA U STRUKOVNIM DRUŠTVIMA**

1. Lilić M. Suvremena molekularna dijagnostika u transfuzijskoj medicini. Stručni sastanak Udruženja transfuziologa Republike Makedonije, Skopje, Sjeverna Makedonija, 20.12.2018.
2. Lilić M. Značaj anti-HPA (antitrombocitnih) protutijela u liječenju hematoloških bolesnika. Stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem "HLA tipizacija u transplantacijskoj i kliničkoj praksi" Sveučilišne kliničke bolnice Mostar i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Mostaru, Mostar, Bosna i Hercegovina, 20.4.2018.
3. Lilić M. Povezanost sistema HLA i bolesti. Godišnji stručni sastanak s međunarodnim sudjelovanjem "Molekularne metode u transfuzijskoj medicini", Udruženja transfuziologa Republike Srpske, Banja Luka, Bosna i Hercegovina, 3.4.2017.